

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Étude du polymorphisme des invertases acides de *Cichorium intybus* L.

Dachelet, Caroline

Award date:
2001

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**ETUDE DU POLYMORPHISME DES INVERTASES ACIDES DE
CYCHORIUM INTYBUS L.**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Caroline Dachelet

Juin 2001

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

ETUDE DU POLYMORPHISME DES INVERTASES ACIDES DE *CYCHORIUM INTYBUS*

Caroline Dachelet

Résumé

Les invertases acides vacuolaires sont des enzymes responsables, entre autres, de la dépolymérisation de l'inuline, un fructo-oligosaccharide d'intérêt agroalimentaire présent dans les racines de *Cichorium intybus*, la chicorée industrielle. L'utilisation de l'inuline en tant qu'agent de texture dans l'alimentation repose sur une longueur minimale des chaînes extraites. Une exposition au froid automnal conduit à une diminution significative de la longueur de ces molécules. Durant ce mémoire, une étude des invertases impliquées dans ce mécanisme de dépolymérisation a été réalisée. Le premier objectif a été d'étudier le polymorphisme de cette classe de molécule sur base d'une collection d'ARNm extraits de racine. Une fréquence relative des différentes isoformes exprimées avant et après l'exposition au froid nous a permis de définir trois séquences sur lesquelles une étude semi-quantitative de la variation du niveau d'expression transcriptionnelle a été conduite. L'isolement du promoteur d'une de ces trois séquences a également été entrepris.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2001

Promoteur: P. Van Cutsem

En premier lieu, je tiens à remercier particulièrement le professeur Pierre Van Cutsem de m'avoir accueillie dans son laboratoire en tant que mémorante.

Je remercie tous les membres du jury, I. Housen, J. Messiaen, P. Renard et J. Vandenhoute pour avoir consacré un peu de leur temps à la lecture de ce mémoire.

Je remercie également mon tuteur, Nicolas Dauchot, pour m'avoir supervisée durant ce mémoire malgré un emploi du temps chargé en tant qu'assistant-doctorant. J'ai une pensée aussi pour tous les membres du laboratoire qui étaient toujours disponibles pour répondre à mes questions ou essayer de régler les problèmes que j'ai pu rencontrés.

Un grand merci à tous mes condisciples pour l'effort qu'ils ont fourni afin de nous réunir le plus souvent possible malgré le fait que nous faisions notre mémoire dans des endroits différents.

Je remercie aussi mes parents, Vincent, le reste de ma famille mais également Catherine, Nathalie, Sandra, Sylvie, Virginie et mes amies du cours de danse. Bref, tous mes proches de Ciney qui ont su me changer les idées quand il le fallait ces derniers mois.

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg	Acide désoxyribonucléique génomique
ARN	Acide ribonucléique
Amp	Ampicilline
Dnase	Désoxyribonucléase
Inv	Invertase
LB	Luria-Bertani
M	Molaire
mM	Millimolaire
pb	Paire de base
PCR	Polymerase chain reaction
RAP-PCR	RNA arbitrarily primed PCR
Rnase	Ribonucléase
RT	Reverse transcription
Tet	Tétracycline
Tris	Tri-(hydroxyméthyl)-aminométhane
U	Unité enzymatique
μl	Microlitre

Résumé

Les fructanes sont des oligosaccharides de réserve. Il sont formés par la fixation successive de monomères de fructose sur une molécule acceptrice de sucrose (glucose-fructose). On les retrouve dans environ 15% du règne végétal chez des plantes telles que la tulipe, le dahlia, le rutabaga, l'agave, de nombreuses graminées et enfin la chicorée, sujet de notre recherche. Chez les plantes, leur taille peut atteindre 50 résidus fructosyls. Le métabolisme des fructanes fait intervenir, d'une part, des enzymes de synthèses, dans lesquelles on retrouve les SST (sucrose:sucrose fructosyltransférase) et FFT (fructan:fructan fructosyltransférase), deux fructosyltransférases, et d'autre part des enzymes de dégradations: les invertases.

Le terme invertase englobe de nombreuses classes de molécules, qui, bien que phylogéniquement proches, présentent des spécificités. Ainsi, les enzymes composants la super famille les invertases peuvent être subdivisées en fonction de leur localisation, optimum de pH et spécificité de substrat. On distingue les invertases dites acides, basiques ou neutres. Au sein des invertases acides, on retrouve des isoformes vacuolaires et pariétales. Au sein des invertases acides vacuolaires, on peut distinguer les invertases au sens strict (responsables de la dégradation du sucrose en glucose et fructose) et les inulinases (responsable de la dégradation de l'inuline). Ainsi quand on parle d'invertases acides vacuolaires, il peut tout aussi bien s'agir d'invertases au sens strict que d'inulinases. La similitude observée entre les séquences ne permettent pas à l'heure actuelle, strictement sur base des séquences, de discriminer ces deux classes d'invertases acides vacuolaires.

Notre travail s'est focalisé sur l'étude des invertases acides vacuolaires impliquées dans la dégradation de l'inuline consécutive à l'exposition au froid de *Cichorium intybus*. Il a en effet été constaté que, suite à une exposition au froid, la taille moyenne des chaînes d'inuline extraites diminuait significativement. L'intérêt du secteur agroalimentaire pour ces fibres se situe principalement au niveau de leur longueur: la dégradation de ces chaînes d'oligofructose en fin de saison de croissance impose une récolte précoce à un moment où les racines n'ont pas encore atteint leur taille maximale.

Au cours de ce mémoire, nous nous sommes attachés à isoler nombre d'isoformes d'invertases présentes dans la racine de *Cichorium intybus*. Une étude de leur distribution relative au cours de la saison a également été réalisée. Sur base de ces résultats préliminaires, la recherche de promoteur et l'analyse de l'évolution du niveau d'expression transcriptionnelle de trois séquences ont été entreprises afin de déterminer leurs rôles respectifs dans le processus de dégradation de l'inuline.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

1. LA CHICORÉE	1
1.1. <i>Systématique de la chicorée</i>	1
1.2. <i>La culture de la chicorée</i>	1
2. LES FRUCTANES	2
2.1. <i>Les carbohydrates</i>	2
2.2. <i>Les fructanes dans le règne végétal</i>	2
2.3. <i>Biosynthèse du fructose</i>	3
2.3.1. <i>Modèle général</i>	3
2.3.2. <i>Les étapes de la biosynthèse</i>	4
2.4. <i>Les différents fructanes</i>	5
2.5. <i>Les tailles des chaînes de fructanes</i>	5
2.6. <i>Rôles des fructanes chez la plante</i>	6
2.6.1. <i>Les fructanes comme réserve hydrocarbonée</i>	6
2.6.2. <i>Les fructanes comme osmolyte</i>	6
2.6.3. <i>Influence des fructanes sur le mouvement du sucrose</i>	6
2.7. <i>Les fructanes chez les autres organismes</i>	7
2.8. <i>Intérêt alimentaire et industriel de l'inuline</i>	7
3. LES INVERTASES	9
3.1. <i>Action catalytique des invertases</i>	9
3.2. <i>Les différentes classes d'invertases et leurs fonctions</i>	9
3.2.1. <i>Les invertases au sens strict</i>	9
3.2.1.1. <i>Les invertases pariétales</i>	10
3.2.1.2. <i>Les invertases vacuolaires</i>	10
3.2.1.3. <i>Les invertases cytosoliques</i>	10
3.2.1.4. <i>Importance des invertases chez la plante</i>	10
3.2.2. <i>Les invertases spécifiques des fructanes</i>	11
3.2.2.1. <i>La Fructose exo-hydrolase ou FEH</i>	11
3.2.2.2. <i>Les inulinases</i>	12
3.2.3. <i>Les invertases chez les autres organismes</i>	12
3.3. <i>La biologie moléculaire des invertases</i>	12
3.3.1. <i>Diversité de la famille génique des invertases</i>	12
3.3.2. <i>Homologie et évolution</i>	13
3.3.3. <i>Analyse de promoteurs</i>	14
3.4. <i>Les sucres modulant l'activité des invertases</i>	14
4. LE FROID ET LES VÉGÉTAUX	15
4.1. <i>Inconvénients et avantages</i>	15
4.2. <i>Adaptation des plantes à la vernalisation</i>	15
4.2.1. <i>Adaptations générales</i>	15
4.2.2. <i>Métabolisme du fructose à basse température</i>	16
4.2.3. <i>Expression des invertases à basses températures</i>	16
4.2.4. <i>Les sucres et la tolérance au froid</i>	17
5. OBJECTIFS	18

MATERIEL ET METHODE

1. CLONAGE DES GÈNES D'INTÉRÊT	19
1.1. <i>Electrophorèse sur gel d'agarose</i>	19
1.1.1. <i>Le marqueur de poids moléculaire et de quantification</i>	19
1.1.2. <i>Solution et tampon utilisés</i>	19
1.1.3. <i>Matériel utilisé</i>	19
1.1.4. <i>Protocole</i>	19
1.2. <i>Polymerase Chain Reaction</i>	20
1.2.1. <i>Composition d'un milieu réactionnel de 50 µl</i>	20
1.2.2. <i>Appareils utilisés</i>	20
1.2.3. <i>Programme typiquement utilisé pour l'amplification de portions de gènes d'invertases</i>	20
1.3. <i>Purification des fragments d'amplification</i>	20
1.3.1. <i>Purification via colonne Microcon 100 (AMICON)</i>	21
1.3.2. <i>Purification par précipitation à l'éthanol</i>	21

1.3.3. Purification par extraction de gel.....	21
1.3.3.1. Sur colonne avec ULTRAFREE DA (Millipore).....	21
1.3.3.2. Sur résine avec QIAEX II Agarose Gel Extraction.....	21
1.4. Clonage.....	22
1.4.1. La ligation.....	22
1.4.2. La transformation.....	23
1.4.2.1. Préparation d'un milieu bactérien.....	23
1.4.2.2. Produits ajoutés après stérilisation du milieu bactérien.....	23
1.4.2.3. Heat Shock.....	23
1.4.3. L'étalement.....	23
1.5. Sélection.....	24
1.5.1. Test blanc/bleu.....	24
1.5.2. PCR de sélection.....	24
1.6. Séquençage.....	25
1.7. Mise en culture de nuit.....	25
2. ALIGNEMENT DE SÉQUENCES.....	26
3. EXTRACTION D'ADN.....	26
3.1. Avec GenElute Plant Genomic DNA kit (SIGMA).....	26
PRÉPARATIFS.....	26
PROTOCOLE.....	27
3.2. Avec TriPure Isolation Reagent (BOEHRINGER MANNHEIM).....	27
3.3. Avec Nucleon "Extraction and purification plant tissue".....	28
3.4. Traitement à la RNase.....	29
3.5. Extraction phénol-chloroforme.....	29
4. RECHERCHE DE PROMOTEURS.....	30
4.1. Qualité de l'ADN génomique.....	30
4.2. Digestion de l'ADN génomique.....	30
4.3. Purification de l'ADNg.....	31
4.4. Ligation des adaptateurs.....	31
4.5. Amplification.....	32
PCR No 2: amorces internes.....	33
5. DOSAGE DES ACIDES NUCLÉIQUES AU SPECTROPHOTOMÈTRE.....	34
1.2. Principe.....	34
5.2. Dosage.....	34
6. RT-PCR SEMI-QUANTITATIVE.....	34
6.1. Mix PCR.....	34
6.2. Programme PCR.....	34
6.3. Protocole de quantification des acides nucléiques dans un gel d'agarose.....	35
6. AP-PCR.....	35
6.1. Principe.....	35
6.2. Mélange PCR.....	35
6.3. Programme PCR.....	36

RESULTATS ET DISCUSSION

1. RECHERCHE D'ISOFORMES D'INVERTASES.....	37
1.1. Matériel utilisé.....	37
1.2. Objectifs et procédure.....	37
1.3. Recherche d'isoformes sur les échantillons 7, 10 et 12.....	38
1.3.1. RT-PCR.....	38
1.3.2. Clonage.....	39
1.4. Recherche d'isoformes des échantillons 6 et 7.....	40
1.4.1. RT-PCR.....	40
1.4.2. Clonage 2.....	41
1.4.3. Séquençage.....	41
1.5. Discussion.....	43
2. RECHERCHE DE PROMOTEURS.....	44
2.1. Choix des isoformes et procédure.....	44
2.2. Extraction d'ADN génomique.....	44
2.2.1. Introduction.....	44
2.2.2. Par la méthode Tripure.....	44

2.2.3. Par la méthode GenElute (SIGMA).....	45
2.2.4. Par la méthode Nucleon	45
2.3. Recherche de promoteur par GenomeWalker (CLONTECH).....	46
2.3.1. Principe	46
2.3.2. Amorces spécifiques in et out.....	47
2.3.3. GenomeWalker.....	47
2.3.4. Resultats de la recherche de promoteurs par GenomeWalker	50
2.4. Recherche de promoteurs par AP-PCR (arbitrarily primed PCR).....	51
2.4.1. Principe	51
2.4.2. Adaptation de la méthode à notre recherche.....	51
2.4.3. Résultats	52
3. ETUDE DES MODIFICATION DU TAUX DE TRANSCRIT D'INVERTASES CHEZ C.	53
INTYBUS EN COURS DE SAISON	53
3.1. Choix de la technique	53
3.2. La RT-PCR semi-quantitative.....	53
3.3. Choix d'un standard.....	54
3.4. Test des amorces CiFr02, CiFr06 et CiFr05.....	55
3.5. La reverse transcription ou RT.....	56
3.6. Recherche de la phase plateau	56
3.7. La PCR semi-quantitative.....	57
3.8. Résultats	57
3.9. Concordance des observation sur gel et de la quantification.....	58
4 .DISCUSSION GENERALE.....	59
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	61
ANNEXES.....	62
BIBLIOGRAPHIE.....	66

I. Introduction

1. La chicorée

1.1. Systématique de la chicorée

Pendant quelques dizaines d'années, le classement des Asteraceae a été sujet à de fréquentes révisions. La classification actuelle de la chicorée est la suivante (Bremer, 1994):

Embranchement:	Spermatophytes
Sous-embranchement:	Angiospermes
Classe:	Dicotylédones
Ordre:	Asterales
Famille:	Asteraceae
Sous-famille:	<i>Lactucoideae</i> ou <i>Cichorioideae</i>
Genre:	<i>Cichorium</i>
Espèce:	<i>intybus</i> Linneus

La chicorée utilisée pour ce mémoire est *C. intybus* var. *sativum*. C'est elle qu'on appelle plus communément chicorée industrielle. Deux autres variétés existent également. Il s'agit de *C. intybus* var. *sylvestre* qui est la chicorée sauvage à partir de laquelle a été sélectionnée la chicorée industrielle, et *C. intybus* var. *foliosum* qui se trouve être notre chicon national.

1.2. La culture de la chicorée

La chicorée, pour se développer, a besoin d'un climat doux et humide. Par conséquent, on la retrouve principalement dans les régions tempérées et chaudes de l'hémisphère nord. Les zones de culture se situent dans des régions de climats maritimes à jours longs comme en Belgique, aux Pays-Bas, dans le nord-ouest de la France ou dans des pays à climats plus continentaux comme l'Allemagne et la Pologne.

En Belgique, on retrouve les principales zones de cultures dans les Flandres, ainsi que dans les régions Tournaisienne, Montoise et Hesbignonne. Selon l'institut national de statistique, la superficie totale de culture était de 13.174 ha en 1999, ce qui conduit tous les ans à une production moyenne de 42 tonnes de racine de chicorée par hectare (Guldentops, 1994). Cela représente aux environs de 23 à 27 % de matière sèche.

Au début du siècle, la chicorée était essentiellement utilisée comme substitut de café. Mais, depuis quelques années, sa culture est en pleine expansion dans notre pays suite aux nombreux débouchés de l'inuline dans le secteur agro-alimentaire.

Le cultivar sur lequel ce travail a été réalisé, provient de cultures expérimentales localisées à Herinne et appartenant à la s.a.Warcoing. Ces plants de chicorée (Ref.97 TM-17-03) ont été obtenus par auto-fécondation du plant mère 93-1 qui a été sélectionné à partir de la variété Polanowicka. Ce sont les racines de chicorée qui ont été prélevées pour ce mémoire car c'est au niveau de cet organe que la plante stocke l'inuline, un fructo-oligosaccharide de réserve énergétique qui fait partie des fructanes.

2. Les Fructanes

2.1. Les carbohydrates

Il existe une catégorie de molécules incluant les sucres et les polysaccharides dérivés de ceux-ci, jouant un rôle particulièrement important, notamment chez les plantes: ce sont les carbohydrates.

Il existe des centaines de carbohydrates différents remplissant diverses fonctions, que ce soit au niveau de la respiration cellulaire, de la synthèse de différents complexes organiques ou bien de la régulation du potentiel osmotique de la cellule.

Certains carbohydrates, les polysaccharides de structure, sont impliqués dans la synthèse de la paroi cellulaire. Il s'agit de la cellulose, de l'hémicellulose et des pectines. D'autre part, le sucrose, l'amidon et les fructanes sont des molécules de stockage non structurales qui apportent le carbone nécessaire comme source d'énergie pour la plante.

Au niveau des feuilles, les sucres fabriqués à partir du processus de photosynthèse sont exportés vers les autres organes de la plante sous forme de sucrose. Ce disaccharide composé d'un résidu glucose et fructose est ensuite clivé en ces deux molécules qui serviront à diverses voies métaboliques.

L'amidon est le principal polysaccharide de réserve et il est présent dans les plastes de la majeure partie des organes. Deux types de polymères sont rencontrés : le premier est l'amylose qui est une molécule de résidus glucoses attachés en $\alpha(1-4)$; le deuxième est l'amylopectine qui possède des résidus, en plus de ceux attachés en $\alpha(1-4)$, substitués à la position six des chaînes linéaires de glucose. Ces carbohydrates sont stockés au niveau des chloroplastes et amyloplastes de la cellule végétale.

Les fructanes, des polymères de fructose, servent de molécules de stockage chez 15 % des plantes à fleurs (Hendry, 1993). Leur particularité tient au fait qu'il s'agit de molécules solubles contrairement à l'amidon et qui, par conséquent, peuvent être accumulées dans la vacuole. Le chapitre qui suit va permettre de se faire une idée générale des fructanes, de leur métabolisme et de leur rôle physiologique chez la plante.

2.2. Les fructanes dans le règne végétal

Les raisons de la préférence de la plante à utiliser les fructanes plutôt que l'amidon comme réserve sont encore mal connues, mais certaines hypothèses pouvant l'expliquer seront abordées dans le chapitre sur le rôle des fructanes.

On retrouve cette molécule chez les astérales, les cypérales, les poales et les liliales (Hendry, 1993; Nelson and Smith, 1986). Le type d'organe où a lieu le stockage est également espèce-dépendant: chez la chicorée, il se fait au niveau des racines. Par contre, il

se situe dans le bulbe chez la tulipe (*Tulipa gesneriana*) ou dans les tubercules chez l'artichaut (*Helianthus tuberosus*), pour ne citer que quelques exemples.

2.3. Biosynthèse du fructane

2.3.1. Modèle général

Au niveau de sa structure chimique, le fructane est une molécule de D-fructose. Chaque chaîne contient cependant un simple résidu D-glucosyl attaché en $\beta(2-1)$ comme dans une molécule de sucrose et localisé à la fin de la chaîne. Les événements majeurs de la synthèse se situent au niveau de la vacuole selon une hypothèse émise par Sash en 1964, confirmée par Frehner *et al.*, 1994.

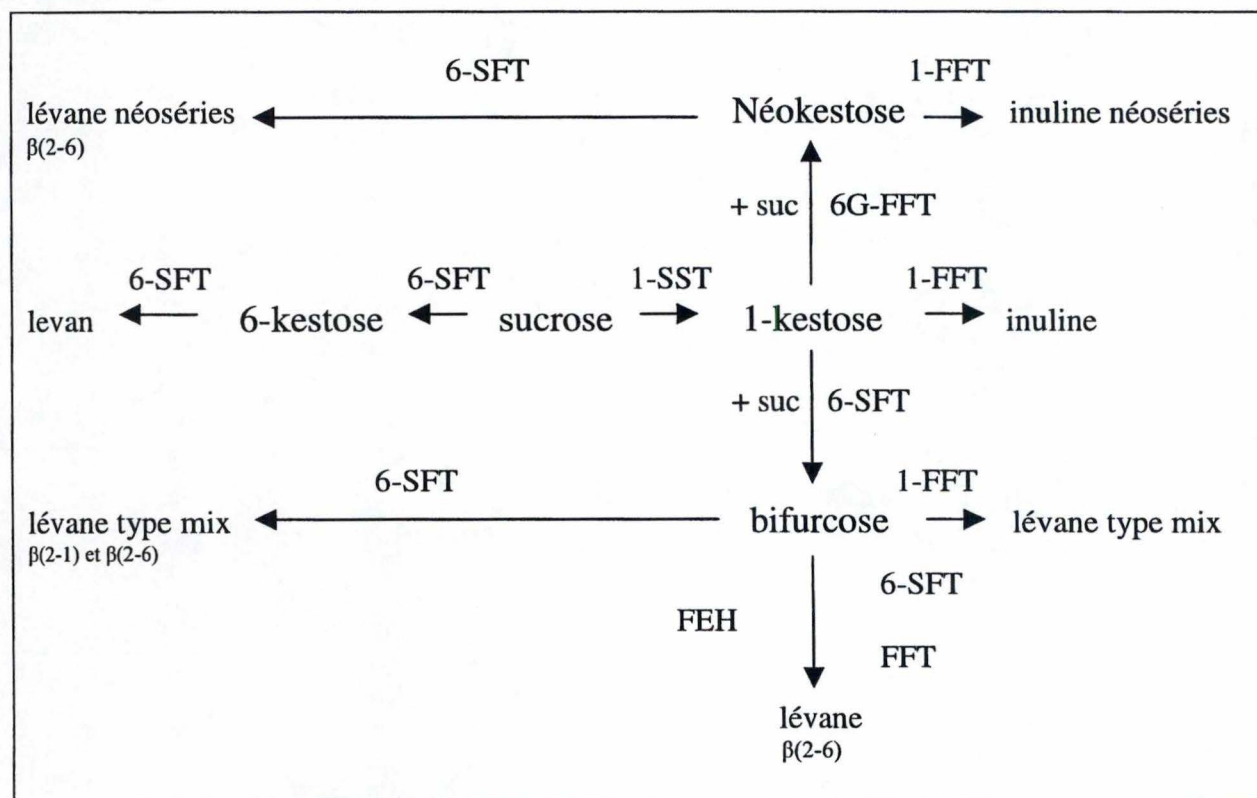


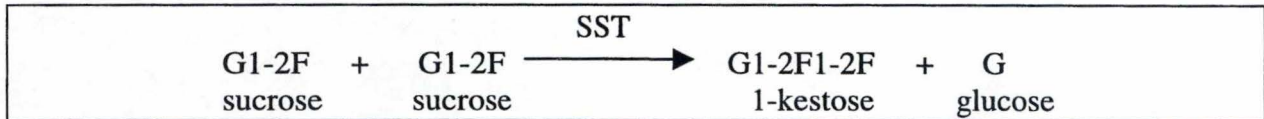
Figure 1 : Biosynthèse des différents types de fructanes (Smeekens and Vijn, 1999)

Les deux enzymes nécessaires et suffisantes pour la synthèse d'un polymère de fructane sont la sucrose-sucrose 1 fructosyltransférase (SST) et la fructane-fructane fructosyltransférase (FFT) selon le modèle d'Edelman et Jefford émis en 1968. Ce modèle a cependant été longtemps sujet à débat car il n'avait jamais été testé avec des enzymes suffisamment purifiées. Des expériences récentes avec des enzymes purifiées de tubercules de *H. tuberosus* montrent que les fructanes peuvent être synthétisés *in vitro* à partir de sucrose par l'action concertée des FFT et SST (Koops and Jonker, 1996). Cela a permis de

valider le modèle précédent. De plus, la synthèse du fructane est la première voie de biosynthèse à avoir été clonée en introduisant les gènes de la SST et la FFT chez une espèce de pétunia ne synthétisant pas naturellement de fructanes (Van de Meer and Koops, 1998). Enfin, les SST et FFT de chicorée ont été pour la première fois clonées en 1997 par le laboratoire de P. Van Cutsem (de Halleux and Van Cutsem, 1997).

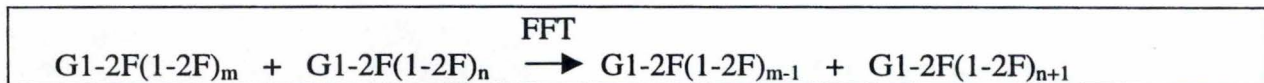
2.3.2. Les étapes de la biosynthèse

L'enzyme responsable de la première étape de la synthèse des fructanes est la SST. Elle catalyse le transfert d'un résidu fructosyle d'une molécule de sucrose vers une autre molécule de sucrose avec la libération de glucose et la synthèse du trisaccharide 1-kestose.



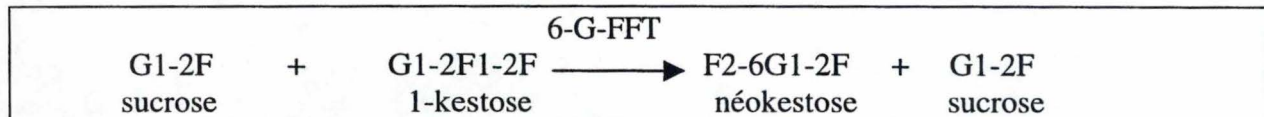
Thermodynamiquement, cette réaction est irréversible dans la direction du 1-kestose.

La SST est seulement capable d'utiliser du sucrose comme substrat, cette enzyme n'est donc pas responsable de la synthèse du fructane polymérique. La FFT entre alors en jeu : elle peut catalyser le transfert réversible de résidus fructosyles entre oligomères et polymères de fructanes.

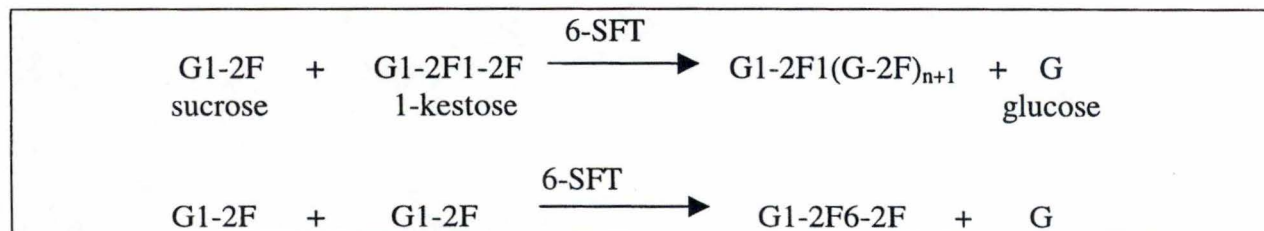


Le sucrose pourrait être donneur de fructosyle pour la réaction catalysée par la FFT, mais il est plus efficace en tant qu'accepteur. Le 1-kestose, lui, peut être donneur.

De même, une deuxième FFT, appelée 6-G-FFT, permet de catalyser le transfert de résidus attachés en $\beta(1-2)$ terminal aux groupes glucose 6-OH sur le fructane accepteur.



Pour compléter le modèle général, une nouvelle enzyme a été découverte. D'abord nommée 6-SST (Simmer *et al.*, 1993), elle fut rebaptisée fructane 6 fructosyltransférase ou 6-SFT. Elle utilise comme donneur de fructosyles uniquement du sucrose et non du fructane et permet d'obtenir des polymères attachés en $\beta 2-6$.



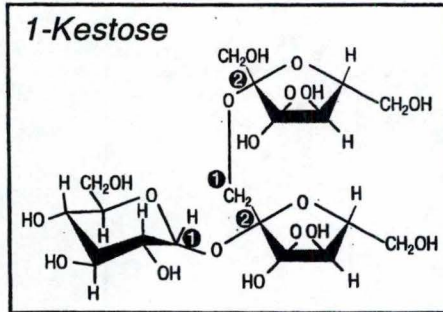


Figure 2 : Structure du 1-Kestose

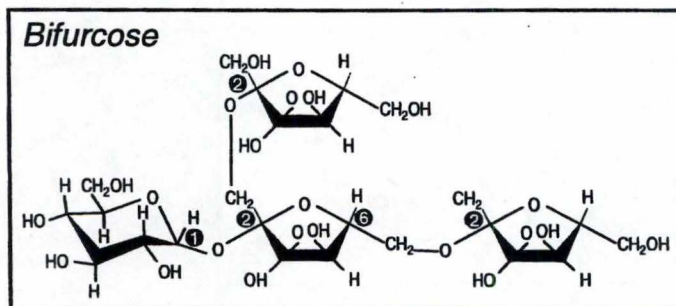


Figure 3 : Structure du Bifurcose

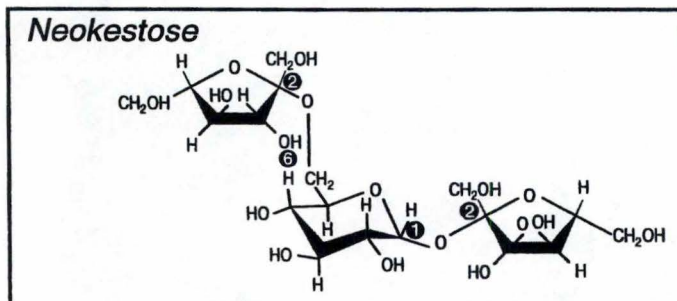


Figure 4 : Structure du Neokestose

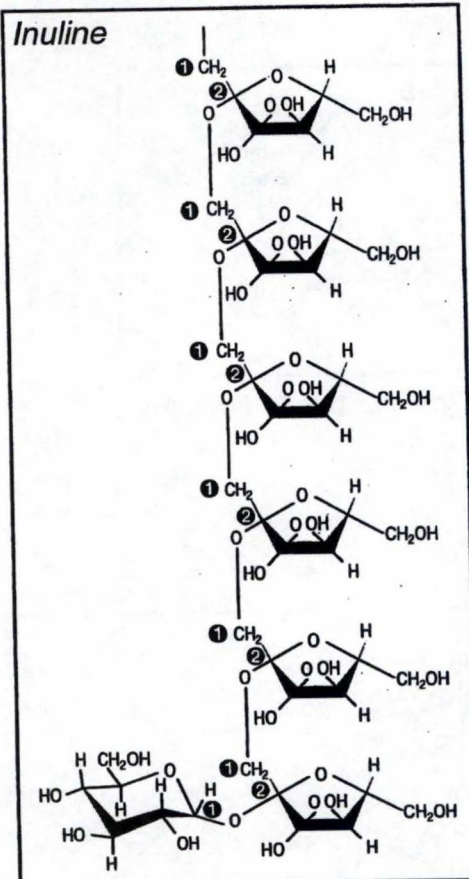


Figure 5 : Structure chimique de l'Inuline

2.4. Les différents fructanes

Le fructane le plus simple est un trisaccharide, le fructosylsucrose, dont il existe trois isomères. Les deux premiers, appelés respectivement 1-kestose et néokestose (figures 2 et 4), possèdent des résidus fructosyles attachés en $\beta(2-1)$, tandis que le troisième, le 6-kestose, a des résidus attachés en $\beta(2-6)$.

Ces trois molécules sont à la base de cinq classes majeures de fructanes : l'inuline, l'inuline néosérie, les lévanes, les lévanes mixtes et les lévanes néoséries.

L'inuline (Figure 5) est un fructane de 1-kestose. On la retrouve dans les espèces appartenant aux Asterales comme la chicorée ou les artichauts (Koops and Jonker, 1996).

L'inuline néosérie est constituée d'unités fructosyles attachées en $\beta 2-1$ sur le carbone 1 et 6 du glucose de la molécule de sucre de départ. Ceci résulte en un polymère de fructane avec une chaîne de fructose de part et d'autre d'une molécule de glucose. Ces fructanes se retrouvent dans les plantes appartenant au Liliaceae comme l'oignon par exemple (Shiomi, 1989).

Les lévanes qui sont formés à partir du 6-kestose, sont synthétisés chez les Graminés (Bonnet *et al.*, 1994).

Les lévanes mixtes sont appelés ainsi car ils sont composés d'unités fructosyles attachées en $\beta(2-6)$ et $\beta(2-1)$. Ce type de fructane se retrouve dans la plupart des espèces appartenant au Poales (Bonnet *et al.*, 1994). La molécule bifurcose, un tétrasaccharide, peut être citée comme exemple.

Enfin, les lévanes néoséries sont des polymères à prédominance de résidus fructosyles attachés en $\beta(2-6)$ sur le glucose de la molécule de sucrose. On les retrouve dans quelques plantes chez les Poales (Livingstone *et al.*, 1993).

2.5. Les tailles des chaînes de fructanes

Plusieurs facteurs peuvent influencer la taille des polymères de fructanes. Par exemple, seule l'inuline peut dépasser un degré de polymérisation de 25 dans les essais de biosynthèse *in vitro*. Une étude sur la variation des différentes chaînes d'inuline a été réalisée dans les différentes espèces d'Asteraceae. Deux hypothèses ont été avancées afin d'expliquer ces différences qui sont spécifiques de l'espèce : Premièrement, il y aurait une différence enzymatique chez les isoformes de FFT. Il a été démontré que la FFT de *H. tuberosus* et la FFT de *C. scolymus* montrent des affinités différentes pour les isomères de fructanes. Deuxièmement, il existerait également une différence dans l'activité des exohydrolases (Hellwege *et al.*, 1998).

On note également des différences de taille chez une même espèce. En effet, la composition des fructanes varie également selon l'état du développement ou selon les facteurs environnementaux. L'expression spécifique au cours du temps des différentes enzymes ou isoenzymes pourrait être aussi responsable de ces changements (Hellwege *et al.*, 1998).

2.6. Rôles des fructanes chez la plante

2.6.1. Les fructanes comme réserve hydrocarbonée

Comme expliqué précédemment, la première fonction des fructanes est de servir de polymère de réserve énergétique pour la plante: il y a dépolymérisation des chaînes de fructanes permettant de fournir des molécules d'hexoses à la respiration. Ce mécanisme sera expliqué par après.

Il est intéressant de s'interroger sur les avantages que peuvent bien les plantes accumulatrices de fructanes d'utiliser cette molécule plutôt que l'amidon, qui est pourtant la substance de réserve dominante chez les plantes supérieures. Suite à différentes observations, on pense que, sous certaines conditions, le stockage du fructane peut permettre de dépasser certaines contraintes imposées par l'accumulation d'amidon. Par exemple, les espèces accumulant les fructanes sont moins sensibles à des baisses de températures que les autres (Pollock, 1986), en partie parce que ces fructanes servent de cryoprotecteurs du liquide vacuolaire. Ce point sera d'ailleurs largement développé dans le chapitre sur le froid. En plus de cette caractéristique, l'accumulation de fructanes donne accès à un compartiment de stockage (la vacuole) physiquement plus grand que dans le cas de l'amidon qui est accumulé dans les amyloplast (Hendry, 1987).

2.6.2. Les fructanes comme osmolite

Les fructanes sont des carbohydrates solubles. Par conséquent, ils peuvent influencer la balance osmotique de la cellule. Les fructanes abaisseraient ainsi le point de congélation des liquides cellulaire et permettraient à la plante une meilleure tolérance au froid (Levitt, 1980). Cette constatation serait d'ailleurs une autre explication à la préférence de certaines plantes à utiliser les fructanes plutôt que l'amidon. La distribution globale des plantes accumulatrices de ce polysaccharide de fructose montre qu'elles sont spécialement abondantes dans les zones de climat tempéré, mais elles sont pratiquement absentes des régions tropicales (Hendry and Wallace, 1993). La biosynthèse de l'amidon diminue d'ailleurs drastiquement lorsque la température descend en dessous de 10°C, tandis que la production de fructanes est moins sensible à cet abaissement (Pollock, 1986).

D'autres fonctions des fructanes comme osmolites ont été suggérées. Une des plus intéressantes serait leur implication dans la réponse au stress hydrique. En effet, une étude réalisée par Pilon-Smits *et al.*, en 1995, a montré que du tabac transformé afin d'être capable de produire du fructane était plus résistant à la sécheresse.

La synthèse des fructanes contrôle également la concentration en sucre de la vacuole. Cette synthèse abaisse le taux de sucrose dans la cellule et empêche le feed-back négatif induit par le sucrose sur la photosynthèse (Pollock, 1986).

2.6.3. Influence des fructanes sur le mouvement du sucrose

La synthèse des fructanes à partir du sucrose devrait influencer le gradient de concentration de cette dernière molécule et, par conséquent, influencer le mouvement du

phloème et le transport des carbohydrates dans la vacuole et ce, indépendamment des autres flux de carbone (Pollock, 1988).

A noter également que le métabolisme du fructane est relié au métabolisme énergétique de la cellule par la libération d'un glucose durant sa dépolymérisation.

2.7. Les fructanes chez les autres organismes

On trouve des bactéries productrices de fructanes aussi bien chez les pathogènes de plantes que chez les bactéries présentes dans le tube digestif des animaux et des humains. Quelques exemples de bactéries chez lesquelles on peut trouver des molécules de fructanes sont les bactéries des genres *Bacillus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Erwinia* et *Pseudomonas* (Hendry et Wallace, 1993).

Généralement, les bactéries produisent des fructanes dont les résidus fructosyles sont liés en $\beta(2,6)$, avec occasionnellement des liaisons en $\beta(2,1)$ (Dedonder, 1966 cité par Vijn et Smeekens, 1999). La plupart de ces molécules sont des lévanes qui peuvent atteindre un degré de polymérisation de plus de 100.000 unités de fructosyle.

Les lévanes bactériens sont synthétisés par une enzyme appelée levansucrase qui produit ces polymères à partir du sucrose.

2.8. Intérêt alimentaire et industriel de l'inuline

L'inuline est bénéfique pour l'homme à différents niveaux. D'abord, c'est une substance peu calorique. Elle est donc intéressante pour l'élaboration de produits "light" en tant qu'édulcorant ou agent de texture.

Elle a également un effet fibre du fait qu'elle ne peut être hydrolysée par les enzymes du tube digestif. Cela signifie qu'elle peut réguler le transit intestinal, favoriser l'excrétion accrue de phénols neutres ou encore avoir une influence positive sur différents paramètres sanguins (Guldentops, 1994).

Lorsque l'inuline arrive au niveau du colon, elle est hydrolysée en petits oligomères et monomères par les bifidobactéries grâce à la sécrétion de β -fructosidases, des enzymes capables de dégrader les molécules dérivées du sucrose. Par un processus de fermentation, ces organismes utilisent les polysaccharides de fructose pour produire de l'énergie afin de proliférer. Il y a également une production de gaz et des acides organiques qui sont utiles à l'hôte. Les conséquences de l'augmentation de ces bactéries bénéfiques sont une baisse du pH du colon et une augmentation de la production des molécules bactéricides produites par celles-ci, ce qui entraîne une diminution des bactéries pathogènes. Grâce à l'inuline, il y a donc modification de la microflore du tube digestif dans un sens positif (Delzenne and Roberfroid, 1994). Enfin, l'inuline a un effet non cariogène : elle peut remplacer le saccharose tout en diminuant la plaque dentaire (Guldentops, 1994).

Par l'utilisation d'inuline dans nos aliments, on peut donc diminuer les risques de troubles gastro-intestinaux, de certains cancers et de diabètes, des pathologies apparaissant généralement suite à un abus de graisses et de sucres (Roberfroid *et al.*, 1998).

Les industries réalisent également l'hydrolyse chimique ou enzymatique de l'inuline pour obtenir du fructose. Ce sucre a également ses avantages. Il est premièrement beaucoup moins calorique que certains autres sucres tout en ayant un pouvoir sucrant non négligeable. Le fructose peut également entraîner la production d'acide lactique par les bactéries bifidus, ce qui entraîne toujours l'élimination des pathogènes, mais également l'absorption de certains ions comme le calcium.

De plus, le fructose a un effet sur le métabolisme : il fait disparaître plus vite l'alcool au niveau du sang et il stabilise le taux d'insuline et de glucose sanguin. Il est donc conseillé chez les personnes diabétiques.

Commercialement parlant, l'inuline est d'autant plus intéressante que la chaîne de fructanes est longue. L'obtention de polymères de degrés de polymérisation élevés se heurte toutefois à une caractéristique physiologique de la plante : l'activation d'hydrolases consécutives à un abaissement de température en fin de saison. Ces hydrolases dépolymérisent l'inuline et libèrent du fructose, modifiant ainsi fortement les propriétés technologiques de l'inuline. Le paragraphe qui suit brosse le portrait de ces enzymes hydrolytiques, les invertases.

Types of invertase	pH optimum	Solubility	Glycosylation
Cell-wall (acid, apoplastic)	4.5–5.0	Insoluble	+
Vacuolar (acid)	4.5–5.0	Soluble	+
Cytoplasmic (alkaline)	7.0–7.8	Soluble	–

Table 1 : caractéristiques générales des différentes invertases au sens strict (Tymowska-Lalanne and Kreis, 1998).

3. Les invertases

3.1. Action catalytique des invertases

La superfamille des invertases regroupe des enzymes clivant le sucrose et/ou les sucres dérivés de ce dernier en molécules d'hexoses. Elle est représentée par un ensemble de protéines à la fois proches et dissemblables à différents niveaux.

Les invertases au sens strict ont pour substrat, essentiellement le sucrose qui, par leur action hydrolytique, est scindé en deux molécules respectivement de glucose et de fructose. Il existe trois types d'invertases caractérisées par leur localisation dans la cellule végétale. Il s'agit des invertases pariétales, vacuolaires et cytoplasmiques. Si les deux premières clivent le sucrose à un pH optimum acide, la dernière, par contre, agit à un pH neutre ou basique (voir table 1).

Par ailleurs, les invertases peuvent utiliser tout substrat ayant un résidu 1 β -D-fructofuranosyle. Le raffinose, par exemple, est clivé en mélibiose et fructose par les invertases pariétales qui présentent une grande affinité pour cette molécule. Dans une moindre mesure, le lactose formé d'une molécule de glucose et de galactose peut également être hydrolysé (Obenland *et al.*, 1993).

Certaines enzymes ont la capacité de catalyser la transfructosylation (passage d'un groupe fructosyle d'une molécule à une autre) en utilisant le sucrose comme un substrat, amenant à la formation de différents isomères du trissacharide kestose (Obenland *et al.*, 1993).

Une autre catégorie d'invertases a pour substrat les fructanes et est responsable de leur dégradation. Parmi celles-ci, l'enzyme la plus connue est sans doute la FEH ou fructane exo-hydrolase. Par ailleurs, le terme général d'inulinases est utilisé dans la littérature pour désigner des hydrolases responsables de la dépolymérisation de l'inuline, tandis que les phléinases ont pour tâche de dégrader les fructanes dont les résidus fructosyles sont attachés en $\beta(1-6)$.

Les invertases spécifiques des fructanes peuvent cependant changer d'activité selon le taux de sucrose présent dans la vacuole. En effet, à haute concentration en sucrose, ces enzymes agissent de concert avec les fructosyle transférases afin d'augmenter la synthèse des polymères de fructanes (Vijn *et al.*, 1998).

3.2. Les différentes classes d'invertases et leurs fonctions

3.2.1. Les invertases au sens strict

Plusieurs isoenzymes de cette catégorie ont déjà été purifiées et caractérisées. La répartition et les différentes fonctions des invertases au sens strict sont résumées à la figure 6.

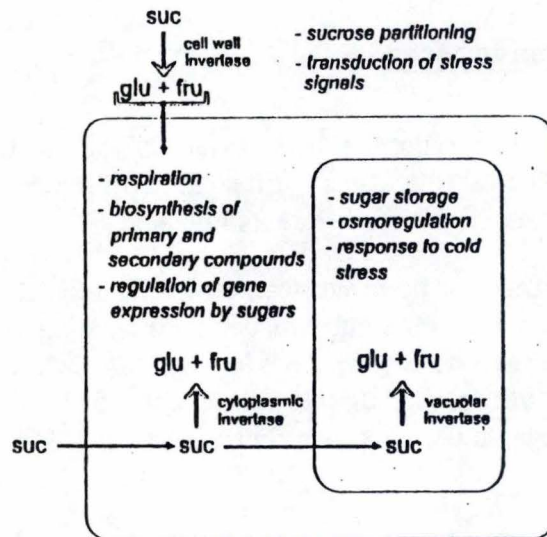


Figure 6 : Répartition et rôle des différentes invertases au sens strict (Sturm, 1999).

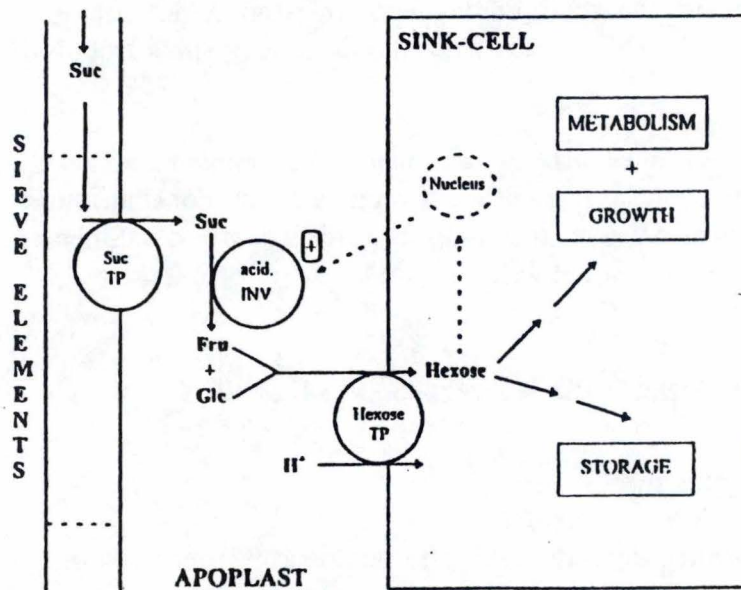


Figure 7 : Action des invertases pariétales (Roitsh and Tanner, 1996).

3.2.1.1. Les invertases pariétales

Ces invertases insolubles à pH acide sont associées, comme leur nom l'indique, à la paroi cellulaire. Leur point isoélectrique élevé (aux alentours de neuf) leur permet d'être chargées positivement à pH physiologique, et ainsi, d'interagir avec les molécules anioniques (principalement la pectine) de la paroi (Laurière *et al.*, 1988).

Ces enzymes extracellulaires seraient responsables de l'hydrolyse du sucrose apoplastique (voir figure 7). Elles interviendraient donc dans la régulation du déchargement du phloème, un tissu contenant des vaisseaux conducteurs dont le rôle est d'amener les nutriments produits par les organes photosynthétiques de la plante vers les organes consommateurs et de stockage : le clivage direct du sucrose permettrait de garder constamment une différence de concentration en sucre entre les deux types d'organes (Roitsh *et al.*, 1995).

Enfin, on note une hausse significative des invertases pariétales lors d'agression par des bactéries ou des champignons. Leur action permettrait d'apporter la source de carbone requise pour les réponses de défense de la plante (Sturm and Chrispeels, 1990).

3.2.1.2. Les invertases vacuolaires

Les invertases vacuolaires sont des glycoprotéines solubles qui travaillent à un pH optimum aux alentours de 5. Elles exercent leur action surtout au niveau de tissus immatures. En effet, outre leur responsabilité dans la composition des sucres de la cellule (au niveau des organes de stockage comme les fruits), ces enzymes permettent d'augmenter le taux de sucres réduits nécessaire au développement de la plante. De plus, elles permettent d'augmenter la pression de turgescence nécessaire à la croissance cellulaire (Tymowska-Lalanne and Kreis, 1998).

3.2.1.3. Les invertases cytosoliques

Ces invertases possédant un pH optimum pour le clivage du sucrose situé entre 7 et 8 se retrouvent spécifiquement dans des organes photosynthétiques matures. Leur situation dans la cellule leur permet d'intervenir dans le métabolisme du sucrose intracellulaire (Van den Ende et Van Laere, 1995). Leur fonction serait de catalyser l'hydrolyse du sucrose dans les cellules dont les invertases vacuolaires n'auraient pas une grande activité afin de fournir directement des hexoses au métabolisme intermédiaire (Tymowska-Lalanne et Kreis, 1998). Cependant, cette hypothèse n'a pas encore été vérifiée car ces enzymes n'ont pas, à notre connaissance, encore fait l'objet d'études approfondies.

3.2.1.4. Importance des invertases chez la plante

Différentes études utilisant la technique anti-sens pour démontrer le rôle des invertases pariétales et vacuolaires chez les végétaux ont été réalisées. Le but était de générer des plantes transgéniques avec un taux réduit d'enzymes. Les premiers essais ont été faits sur la tomate et la pomme de terre, mais aucun phénotype particulier n'a été observé durant le développement des plantes, car les invertases sont exprimées très tard chez ces espèces (Klann *et al.*, 1996 ; Zrenner *et al.*, 1996). Cependant, les fruits transgéniques de la tomate

ont vu leur taille réduite de 30 % par rapport aux fruits contenant une concentration normale en invertases acides.

Tang et coll. (1999) ont travaillé sur la carotte dont les cellules expriment les invertases dès le stade embryonnaire. Ils ont observé que les jeunes pousses en manque d'ARNm d'invertases pariétales possèdent des cotylédons séparés. Par ailleurs, un déficit en invertases vacuolaires amène à un phénotype avec de larges cotylédons, mais les racines et les hypocotyles tendent à disparaître. Dans les deux cas, les adultes possèdent des feuilles s'organisant en structures connectées les unes aux autres.

Ces plantes transgéniques sont placées sur milieu contenant du sucrose. Si du glucose et du fructose sont rajoutés, ces végétaux se développent alors plus ou moins normalement, démontrant que les anomalies sont causées par l'absence d'hydrolyse du sucrose.

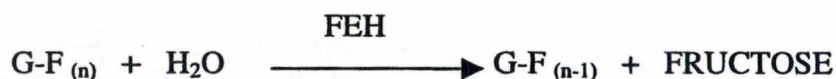
En fait, ces résultats démontrent que les invertases ont de multiples fonctions, notamment au niveau de la répartition des sucres dans la plante. Leur rôle diffère également selon le type d'organe et la catégorie (vacuaire ou pariétale) à laquelle elles appartiennent.

3.2.2. Les invertases spécifiques des fructanes

3.2.2.1. La Fructane exo-hydrolase ou FEH

La fructane exo-hydrolase ou FEH est une enzyme hautement spécifique des fructanes, c'est à dire qu'elle n'utilise aucun autre substrat que ces carbohydrates. Ce n'est donc pas une β -fructosidase, terme général qualifiant une enzyme capable de dégrader aussi bien le sucrose que le fructane.

L'action de cette protéine consiste en une hydrolyse des chaînes de fructanes, la molécule d'eau servant d'accepteur d'un résidu fructosyle. Le fructose libéré peut être converti en sucrose par après.



S'il y a action combinée de la FEH, de la FFT et des enzymes de la synthèse du sucrose, cela conduit à une diminution du degré de polymérisation des polysaccharides. Il n'y a pas de perte nette de fructane, juste un remaniement des résidus fructoses de chaînes plus longues en un nombre plus grand de chaînes plus courtes (Praznik and Beck, 1987).

Plusieurs FEH ont déjà été purifiées. Il s'agit entre autres de la 1-FEH I et 1-FEH II de *C. intybus* (Claessens et al., 1990 ; Deroover et al., 1999), de la 1-FEH de *H. tuberosus* (Marx et al., 1997a) et la 6-FEH de *Lolium perenne* (Marx et al., 1997b). Si les trois premières citées sont responsables de la dépolymérisation des chaînes de fructanes avec des liaisons $\beta(2-1)$, la dernière FEH hydrolyse des chaînes aux liaisons $\beta(2-6)$. Les deux fructanes exo-hydrolases de chicorée se distinguent grâce à leur différence de point isoélectrique qui est

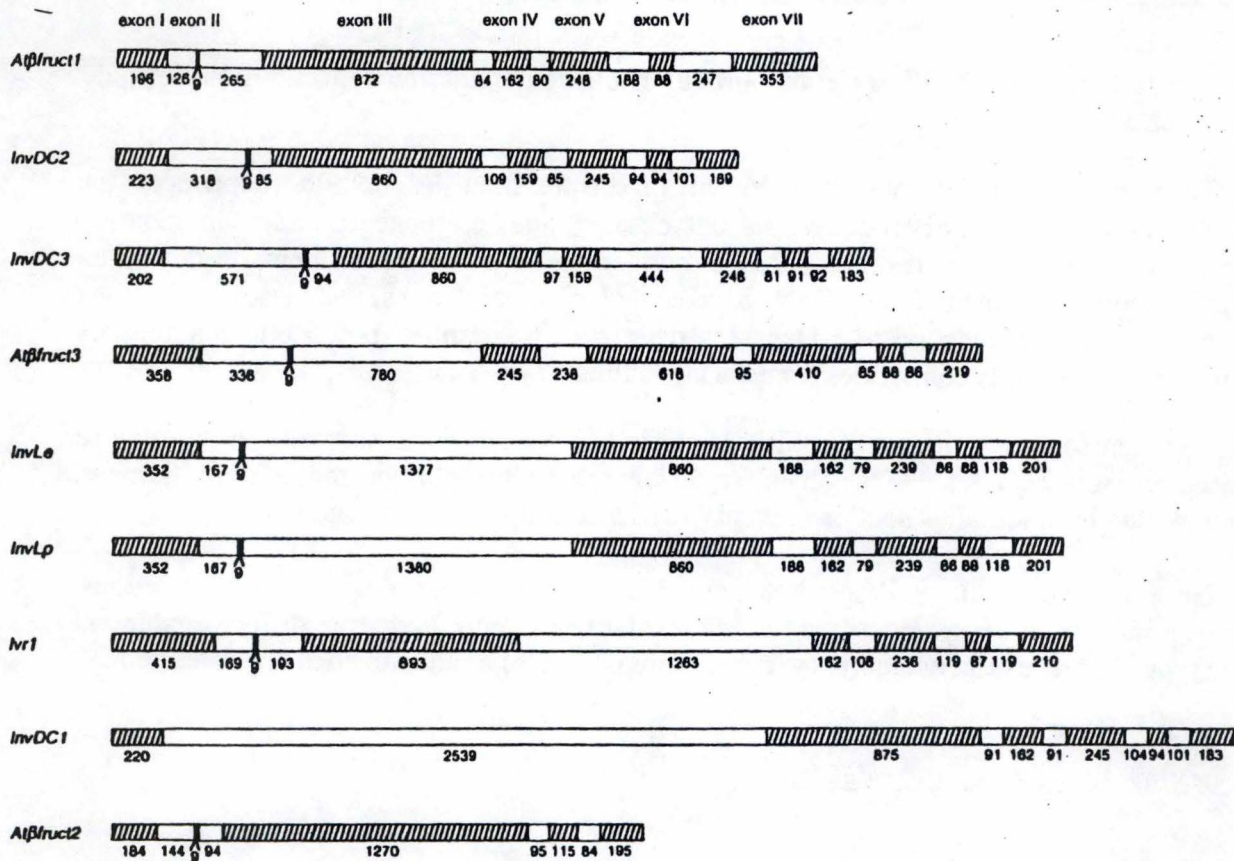


Figure 8 : Différentes séquences d'invertases retrouvées chez la carotte, la tomate et *Arabidopsis thaliana* (Tymowska-Lalanne and Kreis, 1998).

de 6,5 pour la première et 5,2 pour la deuxième, ainsi que par le fait que cette dernière est plus inhibée par le sucrose que la FEH-1 (Deroover *et al.*, 1999).

Si la localisation principale de la fructane exo-hydrolase se trouve être la vacuole (Wiemken *et al.*, 1986), Livingston et Henson (1998) notent la présence de cette enzyme en dehors des cellules lors d'une baisse de température.

3.2.2.2. Les inulinases

Les inulinases qui font partie des fructofuranosylhydrolases sont comme leur nom l'indique, responsables de la dépolymérisation de l'inuline.

Les inulinases trouvées chez les plantes supérieures sont exclusivement des exo-hydrolases. Elles ont la même action que la FEH, c'est à dire qu'elles libèrent des résidus fructosyles.

Ces glycoprotéines vacuolaires à pI acides ont un haut degré de spécificité car elles n'hydrolysent rien d'autre (Claessens *et al.*, 1989). Leur action est, en outre, inhibée par la présence de sucrose et de raffinose (Kaur *et al.*, 1992).

3.2.3. Les invertases chez les autres organismes

Les invertases de levures existent sous deux formes provenant d'un même transcrit subissant différents épissages au niveau de l'ARNm. La première isoenzyme est une glycoprotéine sécrétée, elle permet à la levure de profiter des sources de carbone externe. La seconde est par contre cytoplasmique. Leur expression est régulée par un « répresseur-glucose » (Sturm, 1999)

Chez les bactéries, les enzymes hydrolysant les lévanes sont appelées lévaneses. Tout comme les inulinases, il existe des exo-levanases qui produisent des molécules nommées levanbioses, et des endo-levanases et inulinases qui produisent respectivement des petites chaînes de lévanes et d'inulines. Enfin, la dégradation des lévanes est achevée grâce à l'action d'une β -fructosidase non spécifique qui enlève le résidu fructose terminal (Wanker *et al.*, 1995).

Il est intéressant de noter que les levansucrases responsables de la synthèse des fructanes bactériens peuvent être converties en invertases par une simple mutation, indiquant l'existence d'une forme ancestrale commune à ces enzymes (Chambert and Petit-Glatron, 1991).

3.3. La biologie moléculaire des invertases

3.3.1. Diversité de la famille génique des invertases

Contrairement aux invertases de *S. cerevisiae* dont les différentes isoformes ont un gène commun qui a subi différents épissages, les isoenzymes de plantes proviennent de gènes différents (Unger *et al.*, 1994).

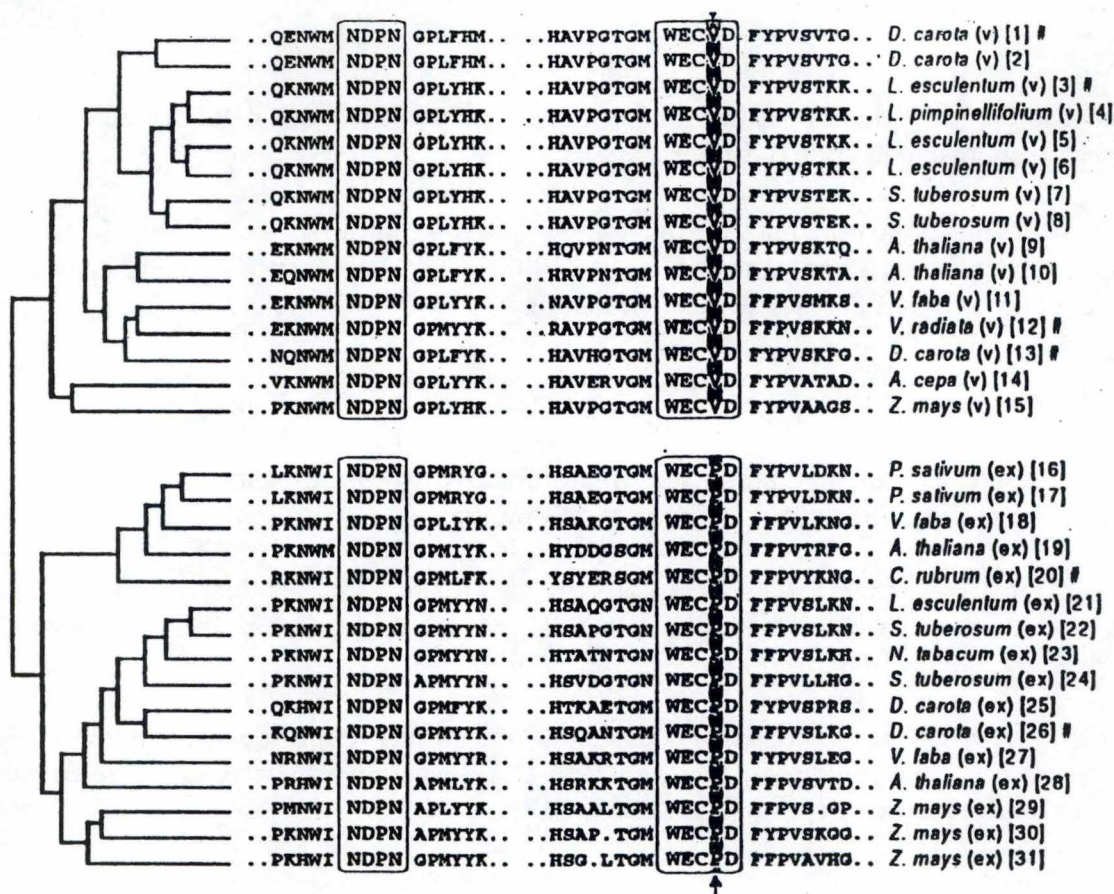


Figure 9 : Relations phylogénétiques et comparaison de séquences d'invertases de plantes (Goetz and Roitsh, 1999).

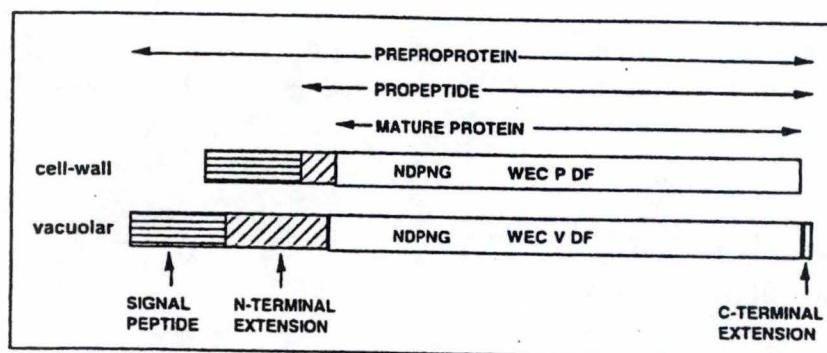


Figure 10 : Comparaison de séquences en acides aminés des invertases vacuolaires et Pariétales (Tymowska-Lalanne and Kreis, 1998).

En février 1997, le laboratoire de P. Van Cutsem a été le premier à avoir introduit des séquences d'invertases de chicorée dans les banques de données. En 1998, plusieurs gènes d'invertases d'autres espèces de plantes supérieures ont été isolés, notamment chez la tomate, la carotte et *Arabidopsis thaliana*. Ces gènes s'organisent soit en sept exons et six introns, soit en seulement six exons et cinq introns (figure 8). Les tailles des exons et introns diffèrent entre les gènes, cependant il existe une sorte de mini-exon commun de neuf nucléotides (l'un des plus petits dans le règne végétal) codant pour une partie (DPN) de la séquence hautement conservée des β -fructosidases : NDPNG. Ce motif se retrouve également chez les mêmes enzymes de bactéries et de levures.

Les séquences en acides aminés déduites des ADNc d'invertases pariétales et vacuolaires ont fait l'objet de comparaisons (figure 9). Les alignements réalisés démontrent que ces deux formes appartiennent à deux classes différentes. En effet, il y a une plus haute similarité entre les membres d'une même forme (vacuaire ou pariétale) d'invertase au sein d'espèces différentes qu'entre les différentes isoformes d'invertase d'une même plante (Goetz and Roitsh, 1999).

Les invertases pariétales et vacuolaires sont d'abord synthétisées sous forme de prépropeptides (figure 10). Durant le transport et la maturation de la protéine, il y a clivage de la séquence guide qui peut être divisée en deux segments : un peptide signal, requis pour l'entrée de la molécule dans le réticulum endoplasmique (Blobel, 1980) et une extension N-terminale. En 1994, Unger et coll. ont observé un propeptide N-terminal beaucoup plus long chez les invertases vacuolaires et une extension C-terminale qui ne se retrouve pas chez les protéines pariétales. Cette extension serait en fait impliquée dans l'adressage de l'enzyme à la vacuole (Sturm, 1999).

Il existe également un autre motif conservé chez les invertases : le motif WEC-P/V-D. Une différence, cependant, est notée au niveau du quatrième acide aminé : une valine chez les enzymes vacuolaires s'est substituée à la proline des invertases pariétales. Cette proline déterminerait, en fait, le pH optimum plus bas pour le clivage du sucrose et la plus haute affinité de ces dernières molécules pour le raffinose (Goetz and Roitsh, 1999).

3.3.2. Homologie et évolution

En 2000, Van den Ende et coll. ont complété l'arbre phylogénétique (figure 11) des invertases en y ajoutant les fructane hydrolases, mais également des fructosyle transférases (qui, pour rappel, ne sont pas des invertases mais des enzymes intervenant dans la biosynthèse des fructanes). Curieusement, la FEH présente, malgré sa localisation au niveau de la vacuole, 44 à 53 % d'identité avec les invertases pariétales contre seulement 38 à 41 % avec les invertases vacuolaires et 33 à 38 % avec les fructosyle transférases. Ces résultats expliqueraient le fait que la fructane exo-hydrolase peut être trouvée dans certaines conditions hors de la cellule, au niveau de l'apoplaste. Cependant, la FEH montre un point isoélectrique beaucoup plus bas que les invertases pariétales, ce qui la différencie du reste du groupe. De plus, elle possède l'extension hydrophobe C-terminale, typique des enzymes vacuolaires.

On peut supposer qu'il existe un groupe d'invertases vacuolaires se rapprochant des pariétales et incluant certaines invertases au sens strict et des fructanes exo-hydrolases, qui

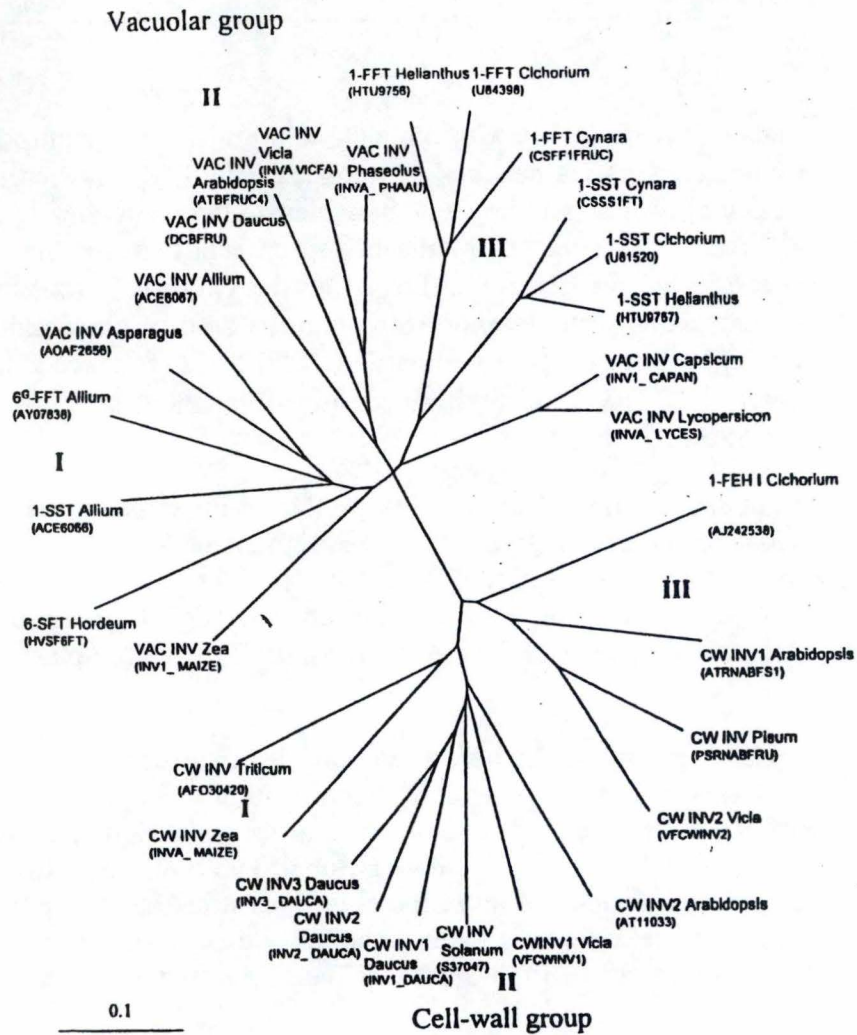


Figure 11 : Relations phylogénétiques entre invertases et fructosyltransférases de plantes (Van den Ende *et al*, 2000).

proviennent d'un gène ancestral commun d'invertase pariétale. De même, certaines invertases vacuolaires des plantes accumulatrices de fructanes auraient évolué en fructosyle transférases suite à quelques changements mutationnels (Wiemken *et al.*, 1995). Cette dernière hypothèse est renforcée par le fait que l'analyse biochimique des SST a montré que ces enzymes ont des activités hydrolytiques (Sprenger *et al.*, 1995).

Une comparaison entre une invertase pariétale de carotte, deux β -fructosidases de *B. subtilis* et une invertase de levure a été réalisée par Sturm et Chrispeels en 1990. Ils ont observé une grande homologie au niveau N-terminal, contrairement à la partie C-terminale qui présente une plus grande variation. Cela conforte l'hypothèse émise par Martin et coll. en 1987 selon laquelle les différentes β -fructosidases ont évolué par fusion de deux segments d'ADN correspondant à ces deux parties de la protéine, le côté N-terminal possédant l'activité catalytique dérivée d'un ancêtre commun.

3.3.3. Analyse de promoteurs

Il y a très peu de similarité de séquence entre les régions non codantes 5' connues des différents gènes d'invertase de plante. Cependant une analyse poussée de séquences en amont des promoteurs montre la présence de séquences régulatrices ayant un haut pourcentage d'identité avec des éléments inductibles par l'auxine, l'éthylène, les blessures ou différentes formes de stress (Ramloch-Lorenz *et al.*, 1993).

3.4. Les sucres modulant l'activité des invertases

De nombreux résultats ont été obtenus ces dix dernières années sur la modulation de l'activité des invertases par les sucres. Cependant, beaucoup de données sont contradictoires. Le sucrose, le glucose et le fructose peuvent jouer le rôle d'activateurs ou d'inhibiteurs selon les cas.

Par exemple, les invertases acides peuvent être divisées en deux classes. La première regroupe les molécules qui sont activées par une augmentation des réserves de carbohydrates et un déficit en sucrose ; tandis que la deuxième contient des enzymes ne subissant aucune régulation de la part du glucose et du sucrose (Sturm, 1999).

Il est intéressant de noter que, parfois, la présence à la fois du substrat et des produits peut réguler de manière similaire l'activité des invertases. C'est le cas, entre autres, des invertases pariétales de l'avoine qui montrent une même activation suite à un traitement de sucrose, glucose ou fructose (Kaufman *et al.*, 1973).

La fructane exo-hydrolase quant à elle est généralement inhibée par la présence de sucrose (De roover *et al.*, 1999).

En plus des sucres, d'autres facteurs peuvent moduler l'activité des invertases. On observe notamment des changements d'expression lors d'une baisse de température. Ce point sera développé dans le chapitre qui suit.

4. Le froid et les végétaux

Les végétaux sont régulièrement soumis durant leur cycle de vie à différentes formes de stress biotique ou abiotique:

- infection par un pathogène, attaque d'insectes
- manque d'eau ou stress hydrique
- variation de la concentration en sel ou stress salin
- variation de la température...

La plante peut réagir très différemment aux fluctuations de température selon l'endroit du globe où elle se trouve et selon l'espèce à laquelle elle appartient. Bien qu'une hausse de température oblige également les végétaux à s'adapter, le chapitre qui suit se focalisera sur les réactions des plantes accumulatrices de fructanes face aux baisses de température.

4.1. Inconvénients et avantages

Soumises à des températures basses, les plantes doivent faire face à certains changements au niveau de leur métabolisme car contrairement aux animaux, elles n'ont pas de régulation thermique. D'abord, le froid a des effets négatifs sur les enzymes. En effet, ces dernières évoluent dans un milieu de viscosité accrue où la diffusion ralentit, leur activité et leur vitesse diminuent ainsi que leur affinité pour leur substrat. Cela entraîne une inhibition ou un ralentissement du métabolisme, notamment au niveau de la photosynthèse et de la respiration. On observe également un trouble des mouvements de solutés du xylème et du phloème, les deux types de vaisseaux conducteurs des végétaux. Il peut même y avoir inhibition du processus de transport (Côme *et al.*, 1992).

De plus, une baisse de température en dessous de 0°C peut conduire à une autre forme de stress, le stress hydrique, car suite à la formation de cristaux de glace dans les parties extracellulaires, la plante change son gradient de potentiel hydrique. L'eau non gelée a donc plutôt tendance à passer à travers la membrane plasmique pour égaler les concentrations et, par conséquent, un déficit en eau se développe avec la réponse de la cellule au gel. Enfin, le gel conduit à des dommages au niveau de la paroi qui accentuent les pertes en eau de la cellule (Bray *et al.*, 2000).

Cependant le froid peut être indispensable dans le cycle de vie de certaines espèces de plantes : des essais de culture de plantes tempérées dans des serres tropicales aboutissent à des végétaux peu ou pas développés. Ceci s'explique par deux phénomènes. Premièrement, le froid agit sur les bourgeons de la plante qui sont un ensemble d'organes immatures. Leur dormance apparaît à la fin de l'été, mais est levée par le froid, l'hiver. Deuxièmement, l'élongation de la tige de certaines fleurs dépend d'une période où la température doit descendre en dessous de 10°C, la vernalisation (De Hertogh and Le Nard, 1993).

4.2. Adaptation des plantes à la vernalisation

4.2.1. Adaptations générales

Les changements physiologiques, chimiques et métaboliques que les plantes réalisent lors d'une baisse de température sont nombreux et complexes. Il ne s'agira ici que de citer brièvement les principales adaptations au niveau cellulaire.

Premièrement, un changement de la nature chimique des molécules se produit au niveau de la membrane plasmique afin que celle-ci n'ait pas une trop grande viscosité : les lipides augmentent leur degré de saturation afin que la membrane garde une certaine fluidité.

Ensuite, il y a augmentation de nombreux composés (protéines, lipides, métabolites,...) parmi lesquels, une classe particulière de molécules : les protéines apoplastiques PR dont les protéines « osmotine-like » qui peuvent retarder la croissance des cristaux de glace en formant des grands complexes interagissant avec ceux-ci.

La cellule tente également de modifier la structure de certaines de ses enzymes afin qu'elles restent stables et actives malgré les basses températures.

Enfin, le taux de sucres cellulaires est augmenté, ce qui justifie l'étude des fructanes et des invertases dans ces conditions (Bray *et al.*, 2000).

4.2.2. Métabolisme du fructane à basse température

Les plantes accumulatrices de fructanes réagissent différemment à la baisse de température selon l'espèce à laquelle elles appartiennent et l'endroit où elles stockent leurs réserves de carbohydrates.

Chez les céréales, on note une augmentation du degré de polymérisation des chaînes de fructanes durant la période de froid. Une étude de Santoiani et coll. (1993) a montré que chez le blé, une augmentation du sucrose et des molécules de fructanes se produisait au niveau des racines et surtout des feuilles. Cette production de fructanes est corrélée avec une augmentation du taux de SST et une diminution du taux de FEH (Yukawa *et al.*, 1995).

Chez l'orge, la concentration en fructane diminue à basse température alors que le taux de phléinases et d'inulinases demeure constant. Si on descend en dessous de 0°C, il y a augmentation de l'activité des phléinases : on observe un changement d'expression uniquement chez ce type d'invertases. Ce qui démontre que ces enzymes sont induites, tandis que les inulinases sont constitutives (Yukawa *et al.*, 1998).

Chez la chicorée, une soudaine diminution de température donne lieu à une forte activité de la 1-FEH. La concentration en fructose libre augmente alors assez vite (Van den Ende and van Laere, 1996a et 1996b).

De plus, durant le stockage à basse température, 80% du sucrose est localisé dans la vacuole (Frehner *et al.*, 1994). Quand il y a saturation, le sucrose est exporté dans la partie en croissance de la racine et le taux de FEH II devient important. La FFT continue à agir, elle transfère un résidu fructosyle de l'inuline sur une molécule de fructose. Il y a alors formation de deux séries d'oligosaccharides réduits (De roover *et al.*, 1999).

4.2.3. Expression des invertases à basses températures

L'expression des invertases vacuolaires est significativement augmentée lors des baisses de température. Elles seraient impliquées dans la tolérance au froid de la plante (Sturm and Tang, 1999).

Une étude des invertases acides sur un autre modèle, le pamplemousse, a démontré que ces enzymes sont induites par le froid (Hyde *et al.*, 1998). Lorsque la température descend en dessous de 10° C durant l'hiver, il y a une corrélation entre la diminution de sucrose et l'augmentation de sucres réduits. Cette augmentation est entraînée par un changement d'activité d'une invertase acide soluble qui se développe en hiver et disparaît au printemps ; à ce moment, le rapport sucrose/sucres réduits est de nouveau inversé.

Les invertases joueraient également un rôle dans l'élongation de la fleur et le développement des bourgeons lors de l'abaissement de température. Chez la tulipe, il y a augmentation du volume de la cellule en parallèle avec l'augmentation d'activité d'une invertase acide. Cette dernière crée un gradient de sucrose qui forcerait l'entrée d'eau dans les cellules et favoriserait ainsi l'élongation (Balk and de Boer, 1999).

Une étude de Bournay et coll. (1996) sur deux invertases de pommes de terre a démontré que l'ARN pré-messager de l'une d'entre elles peut être sujet à un épissage alternatif induit par une baisse de température. Ceci a pour conséquence la perte du mini exon de neuf paires de bases codant, pour rappel, pour une partie du motif conservé des β -fructosidases. La signification physiologique de cette perte est toujours à l'étude.

4.2.4. Les sucres et la tolérance au froid

La plupart des plantes vivaces, quand elle sont sous la neige ne peuvent plus réaliser la photosynthèse. Elles doivent donc aller chercher dans leurs réserves de carbohydrates les sucres réduits. La dépolymérisation de ces réserves est alors augmentée et les monosaccharides et les disaccharides obtenus à partir des fructanes sont utilisés comme osmolites régulateurs du potentiel hydrique de la cellule sous la neige. La plante tente alors de limiter les pertes en eau (Yukawa *et al.*, 1988). Les sucres réduits sont également impliqués dans le mécanisme de résistance aux dégâts du gel au niveau de la paroi et de la membrane : ils peuvent servir de cryoprotecteurs de protéines et de membranes (Hyde *et al.*, 1998).

Chez quelques espèces, la production de fructanes est par contre augmentée à basses températures. Pour rappel, le blé démontre une plus grande production de fructanes au niveau des feuilles que dans les racines. L'explication tiendrait au fait que ces polymères de sucres stabiliseraient les liposomes et serviraient de cryoprotecteurs de protéines lors du gel en formant de gros complexes. Or, le gel affecte plus les parties aériennes des plantes que les parties enfouies, qui sont plus protégées (Yukawa *et al.*, 1995).

5. Objectifs

Un des gros problèmes rencontrés dans la culture de la chicorée industrielle en vue de la production d'inuline provient de la dégradation de cette dernière par l'action de fructane exo-hydrolases en fin de la croissance de la chicorée. Ce moment correspond au premier coup de gel, vers la fin de l'automne, mais sans que l'on ne connaisse déjà le seuil exact de température qui provoque ce changement dans le métabolisme des fructanes.

Une solution serait de bloquer cette dépolymérisation en empêchant l'expression de ces enzymes : les différentes chaînes d'inuline garderaient ainsi leur intégrité. Or, nous savons qu'il existe un large polymorphisme chez les gènes d'invertases et que ces dernières sont par ailleurs indispensables chez la plante. On ne peut par conséquent pas tenter une répression sans discrimination de ces gènes au risque de générer des anomalies chez le végétal transformé. Il est donc indispensable de déterminer les isoformes précises de fructane exo-hydrolases impliquées dans le mécanisme de dégradation des fructanes à basse température. L'identification de ces isoformes permettrait alors de modifier la chicorée génétiquement par la technique anti-sens dirigée sélectivement contre ces gènes spécifiques.

Le docteur Van den Ende de la K.U.Leuven et ses collaborateurs ont réalisé un travail important sur les invertases responsables de la dépolymérisation de l'inuline, notamment en les caractérisant biochimiquement et en étudiant leur présence et activité lors de baisses de températures. Ainsi, ils ont pu cloner et réaliser une analyse fonctionnelle de deux fructane exo-hydrolases appelées respectivement FEH-1 et FEH-2. A basse température, ils ont également observé une augmentation de l'activité de ces deux isoformes. Ce phénomène provoquerait la dégradation de l'inuline à la fin de l'automne.

Au départ de ces observations, nous avons assigné trois objectifs principaux à ce mémoire :

Le premier objectif serait de déterminer la présence éventuelle de plus de deux isoformes d'invertases acides vacuolaires impliquées dans la dégradation de l'inuline. La recherche de ces différentes isoformes serait réalisée à partir d'ARNm de racines de chicorées prélevées tout au long de la saison de croissance qui s'étale entre juillet et janvier. Nous tenterions ensuite d'analyser la présence et l'abondance de transcrits de ces invertases dans les différents prélèvements, afin de déterminer si l'expression d'une isoforme peut être corrélée avec les fluctuations de température.

Un deuxième objectif serait de réaliser une recherche de promoteur sur des isoformes nous paraissant intéressantes. Pour des raisons autant fondamentales qu'appliquées, il est en effet indispensable de posséder des promoteurs impliqués dans la régulation des FEH. Le kit GenomeWalker (Eurogentec) et la RAP-PCR seraient deux méthodes utilisées afin de mener cette recherche.

Enfin, un troisième objectif serait de confirmer une éventuelle différence d'expression des isoformes de notre choix lors de la baisse de température. Pour ce faire, une RT-PCR semi-quantitative serait réalisée sur celles-ci à partir des tous les prélèvements d'ARNm. Nous pourrions ensuite comparer ces résultats avec ceux que nous aurions obtenus lors de la première partie de ce mémoire, mais également avec ceux de Van den Ende. Il sera alors intéressant de voir si les observations faites sur les transcrits sont corrélées avec les observations faites sur les taux de protéines.

II. Matériel et méthodes

Smart Ladder

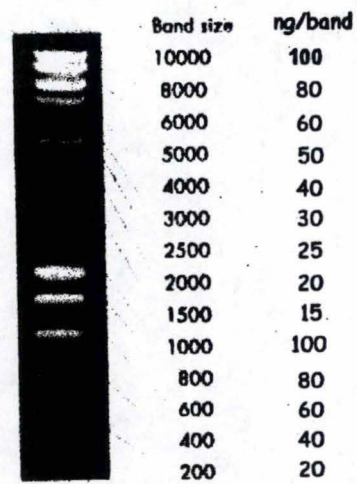


Figure 1 : Smart Ladder

1. Clonage des gènes d'intérêt

1.1. Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose sépare les fragments d'ADN en fonction de leur taille. La vitesse de migration des fragments est inversement proportionnelle à la taille de ceux-ci et du pourcentage en agarose du gel utilisé lors de la migration. La taille des amplicons est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Nous avons utilisé comme marqueur de poids moléculaire la Smart Ladder (Eurogentec).

1.1.1. Le marqueur de poids moléculaire et de quantification

Les données sont applicables lors du chargement de 5 µl de standard Smart ladder (Eurogentec). La figure 1 montre la migration de ces 5 µl.

Taille (en bp)	quantité
10000	100 ng
8000	80 ng
6000	60 ng
5000	50 ng
4000	40 ng
3000	30 ng
2500	25 ng
2000	20 ng
1500	15 ng
1000	100 ng
800	80 ng
600	60 ng
400	40 ng
200	20 ng

1.1.2. Solution et tampon utilisés

Solution de chargement (5 fois concentrée):	glucose 40 % bleu de bromophémol 0,025 %
Tampon TAE (1 fois concentré)	Tris-acétate 40mM (pH 8,0) EDTA 1mM

1.1.3. Matériel utilisé

Cuves d'électrophorèses:	Pharmacia LKB GNA100 Mini-PROTEAN II cell BIO-RAD
--------------------------	--

1.1.4. Protocole

- Porter à ébullition 50 ml de tampon TAE 1X contenant l'agarose 1 à 2 % selon le matériel à faire migrer, jusqu'à obtention d'une solution limpide homogène
- Quand la température de la solution est redescendue à environ 60°C, ajouter 2µl de bromure d'éthidium (solution en stock à 2mg/ml)
- Couler l'agarose sur le support *ad hoc* muni d'un peigne
- Après solidification de l'agarose, immerger le gel dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE (1x)
- Déposer les échantillons dans les puits (2 à 25 µl d'échantillon + 2 à 4 µl de solution de chargement) et effectuer la migration à l'intensité désirée (de 70 à 80 mA).

Visualiser l'ADN du gel sous U.V. (transilluminateur avec longueur d'onde à 302 nm).

1.2. Polymerase Chain Reaction

1.2.1. Composition d'un milieu réactionnel de 50 µl

- x µl d'ADN ou ADNc.
- 1 µl d'amorce droite (10 ou 100 pm selon les programmes et les conditions).
- 1 µl d'amorce gauche (10 ou 100 pm).
- 5 µl de tampon commercial concentré 10 X avec Mg.
- 0,4 µl de Taq polymérase (2 unités, Taq Boehringer Mannheim, stock à 5 U/µl)
- Porter à volume avec de l'eau stérile.

1.2.2. Appareils utilisés

Appareils PCR: Mini cycler MJ Research (Biozym).
 PTC-100 Programmable thermal controller (Biozym)
 Gem Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer)
 I cycler (BioRad)

1.2.3. Programme typiquement utilisé pour l'amplification de portions de gènes d'invertases

Etape	Température C°	Durée min.	Nombre de cycle
Dénaturation longue	94	10	1
Dénaturation	94	1	8
Hybridation	53	1	
Elongation	72	1	
Dénaturation	94	1	30
Hybridation	58	1	
Elongation	72	1	
Terminaison	72	10	1

1.3. Purification des fragments d'amplification

1.3.1. Purification via colonne Microcon 100 (AMICON)

- Porter à 500 µl le produit PCR en ajoutant de l'eau stérile
- Placer le tout sur la colonne Microcon 100
- Centrifuger à 4500 g pendant 15 minutes
- Retourner la colonne et la placer sur un nouvel tube
- Ajouter 20 µl de tris HCl 5M pH 8. Attendre 5 minutes
- Centrifuger à 1500 g pendant 15 minutes.

L'éluat récolté contient l'ADN.

1.3.2. Purification par précipitation à l'éthanol

- Ajuster, avec du NaCl 1M, la concentration en sel de l'échantillon afin d'obtenir une solution de 0,2 à 0,35M
- Ajouter deux volumes d'éthanol absolu
- Mettre à -20°C pendant une heure
- Centrifuger à 4°C à 15000 g pendant trente minutes
- Enlever le surnageant et drainer
- Laver avec 1 ml d'éthanol 70%
- Centrifuger à 12000 g pendant 10 minutes
- Enlever le surnageant et drainer
- Utiliser l'évaporateur sous vide afin d'évaporer totalement l'éthanol
- Resuspendre l'ADN dans de l'eau millipore stérile.

1.3.3. Purification par extraction de gel

1.3.3.1. Sur colonne avec ULTRAFREE DA (Millipore)

- Réaliser un gel d'agarose préparatif 0,8 %. Réduire la quantité de bromure d'éthidium et minimiser l'exposition du gel sous la lampe U.V. lors de l'excision. L'extraction du gel se fait via le kit ULTRA FREE DA (Millipore).
- Exciser la bande d'ADN du gel d'agarose avec une lame de scalpel stérile
- Minimiser au maximum la taille du morceau de gel en retirant les excès d'agarose
- Placer une heure à -20°C
- Placer le morceau sur la colonne en veillant à bien écraser le gel
- Centrifuger à 7000 g pendant 10 minutes.

La phase aqueuse obtenue contient l'ADN.

1.3.3.2. Sur résine avec QIAEX II Agarose Gel Extraction

Protocole

- Placer le morceau d'agarose contenant le fragment à purifier dans un tube de 1,5 ml. Ajouter trois volumes de tampon QX1 pour un volume de gel pour des fragments d'ADN de 100 bp à 4 kb.

- Resuspendre le QIAEX II en le vortexant durant 30 secondes. Ajouter le QIAEX II au tube dans les quantités adéquates :

<2 µg ADN	Ajouter 10 µl de QIAEX II
2-10 µg ADN	Ajouter 30 µl de QIAEX II
Chaque 10 µg additionnel d'ADN	Ajouter 30 µl additionnel de QIAEX II

- Incuber à 50°C durant 10 minutes pour solubiliser l'agarose et attaché l'ADN. Mélanger en vortexant toutes les deux minutes pour garder le QIAEX II en suspension. L'adsorption d'ADN sur QIAEX II n'est efficace qu'à pH<7.5. Il faut vérifier que la solution est jaune, couleur qui indique qu'elle est au pH adéquat (présence d'un indicateur de pH). Si la couleur est orange ou pourpre, ajouter 10 µl d'acétate de sodium 3M, pH 5.0. La couleur devrait tourner au jaune. L'incubation doit alors continuer durant un temps additionnel de cinq minutes.
- Centrifuger le tube durant 30 secondes. Enlever le surnageant avec une pipette.
- Laver le culot avec 500 µl de tampon QX I. Resuspendre le culot en vortexant. Centrifuger le tube durant 30 secondes à 13000 g et enlever le surnageant avec une pipette. Cette étape de lavage permet d'enlever les contaminants d'agarose résiduels.
- Laver le culot deux fois avec 500 µl de tampon PE. Resuspendre le culot en vortexant. Centrifuger le tube durant 30 secondes à 13000 rpm et enlever le surnageant avec une pipette. Cette étape de lavage permet d'enlever les sels résiduels.
- Sécher le culot durant 20 minutes à l'air libre jusqu'à ce qu'il obtienne une couleur blanche. Le temps de séchage est rallongé de 10 minutes si 30 µl de QIAEX II ont été utilisés.
- Pour éluer l'ADN, ajouter 20 µl de 10 mM de Tris-HCl, pH 8.5 et resuspendre le culot en vortexant. Incuber durant 5 minutes à la température de la pièce.
- Centrifuger durant 30 secondes. Retirer le surnageant avec une pipette, celui-ci contient l'ADN
- Eventuellement, répéter les deux étapes précédentes et combiner les éluats : une seconde étape d'élution augmentera la récupération de 10 à 15 %.

1.4. Clonage

1.4.1. La ligation

Protocole relatif au TA cloning Kit (invitrogen)
Composition (pour un volume de 10 µl):

- 1 µl de Ligation Buffer 10 X
- 2 µl de vecteur PCR II (25 ng/µl)
- 1µl de T4 DNA ligase

- x µl de produit PCR
- Compléter avec de l'eau stérile.

Incuber la réaction de ligation à 14°C pendant au moins quatre heures. Ensuite, centrifuger la réaction de ligation et placer sur glace jusqu'à utilisation.

1.4.2. La transformation

1.4.2.1. Préparation d'un milieu bactérien

Milieu utilisé: Luria-Bertani (LB) agar

Composition pour 1 L de milieu: 10 g de bactotryptone
5 g de yeast extract
10 g de NaCl
15 g d'agar

Ajuster à pH 7.5 et mettre à volume.

1.4.2.2. Produits ajoutés après stérilisation du milieu bactérien

Produit	Stock	concentration finale	dilution
Ampicilline	50 mg/ml	60 µg/ml	eau stérile
Tétracycline	5 mg/ml	50 µg/ml	eau stérile
X-gal	20 mg/ml	35 µg/ml	N-diméthylformamide
IPTG	20 mg/ml	35 µg/ml	eau stérile

1.4.2.3. Heat Shock

- Pipeter 1 à 4 µl de réaction de ligation dans des bactéries compétentes (TOP 10 F' Tet^R Invitrogen) et mélanger avec précaution
- Incuber sur glace pendant 30 minutes
- Choc thermique pendant exactement 30 secondes dans un bain d'eau à 42°C
- Placer sur glace pendant deux minutes
- Ajouter 250 µl de milieu SOC à température ambiante sur les cellules
- Placer dans un bain à 37°C avec agitation durant une heure. Garder ensuite les cellules sur glace.

1.4.3. L'étalement

L'étalement se fait sur des boîtes de culture de 25 ml dans lesquelles a été coulé le LB agar avec l'ampicilline et la tétracycline. Quand le milieu s'est solidifié, étaler 35 µl de x-gal et 35 µl d'IPTG aux concentrations stock définies ci-avant. Ensuite, attendre 15 minutes et étaler les bactéries transformées (le volume de bactéries transformées étalées varie de 10 à 100 µl par boîte).

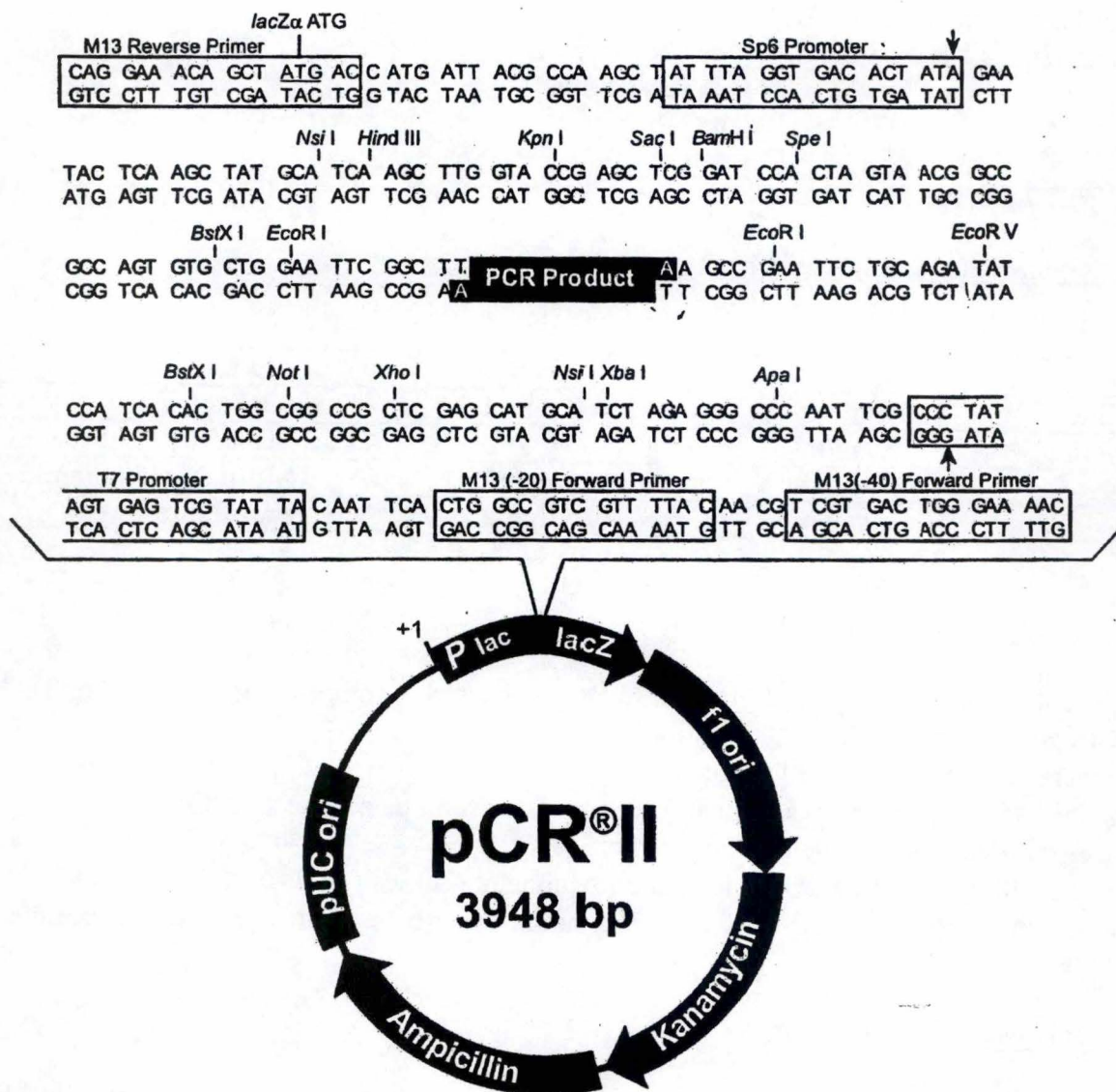


Figure 2: veter PCR II (TA Cloning Kit Dual Promoteur, instruction manual, INVITROGEN).

1.5. Sélection

1.5.1. Test blanc/bleu

Le test lac Z, ou test blanc/bleu, est une méthode de sélection de bactéries transformées basée sur la propriété de complémentation intragénique que possèdent les recombinants issus de la transformation.

La souche bactérienne utilisée est déficiente en β -galactosidase. Elle possède cependant une séquence F' dont une partie code pour la région C- terminale inactive α' de la β -galactosidase. La partie N-terminale inactive α est, elle, codée par une portion de gène se trouvant dans le vecteur de transformation.

Dans les bactéries transformées, il y a complémentation intragénique lors de l'assemblage des peptides α et α' inactifs qui vont donner une galactosidase fonctionnelle.

Le site multiple de clonage du vecteur est intégré, par construction, en phase dans une partie peu importante du gène lac Z sans perturber l'activité de la β -galactosidase. Le phénomène de complémentation intragénique sera possible si le vecteur ne contient pas d'insert. Par contre, si le vecteur contient un insert, la région codant pour la partie N-terminale de la β -galactosidase sera disruptée et la complémentation intragénique alors rendue impossible car le peptide α ne peut plus former une β -galactosidase fonctionnelle en s'associant au peptide α' .

En présence d'IPTG et de X-Gal, les bactéries transformées avec des vecteurs refermés sur eux-mêmes ou avec des vecteurs contenant un petit morceau d'insert produiront un β -galactosidase fonctionnelle et apparaîtront comme bleues. Dans le cas de bactéries transformées avec le vecteur contenant l'insert, il n'y aura pas de β -galactosidase fonctionnelle et les colonies formées par celles-ci apparaîtront blanches.

1.5.2. PCR de sélection

Procéder tout d'abord à un repiquage des colonies potentiellement intéressantes, isolées suite au test blanc/bleu, sur des boîte Tet+ Amp+ (c'est à dire les colonies présentant une coloration blanche) à l'aide d'embouts stérils.

Réaliser une PCR de screening à partir de ces colonies avec des amorces dites "universelles", externes à l'insert, dont les séquences homologues sont présentes sur le vecteur PCR II (Figure 2). Le produit d'amplification est chargé sur gel d'agarose 1% et la taille des bandes est estimée par comparaison avec un standard (Smart Ladder).

Les séquences des amorces utilisées sont respectivement:

M13 Forward: 5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'
M13 Reverse: 5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA-3'

Template	Quantity
PCR product:	
100–200 bp	1–3 ng
200–500 bp	3–10 ng
500–1000 bp	5–20 ng
1000–2000 bp	10–40 ng
>2000 bp	40–100 ng
single-stranded	50–100 ng
double-stranded	200–500 ng
cosmid, BAC	0.5–1.0 µg
bacterial genomic DNA\	2–3 µg

Table 1 : Quantité d'ADN recommandée

Le programme utilisé pour cette PCR est le suivant:

Température(°C)	Temps(minutes)	Nombre de cycle
94	4.5	1
94	1	35
55	1	
72	2	
72	5	1
10	infini	1

Mix PCR pour un volume de 50 µl:

- 5 µl de tampon Taq 10 X
- 1 µl de dNTP 10 mM
- 1 µl d'amorce M13 reverse (10 pm)
- 1 µl d'amorce M13 forward (10 pm)
- 0,4µl de Taq Polymerase (5U/µl)
- 41,6µl d'eau stérile

Chaque tube contient 10 µl de mélange et quelques cellules provenant d'une colonie de bactéries positives au test blanc/bleu.

1.6. Séquençage

Les clones positifs après le criblage sont séquencés. Le séquençage se compose premièrement d'une réaction de préséquénage utilisant des amorces s'hybridant sur des sites externes à l'insert. Nous utilisons à nouveau les amorces M13 Forward et M13 Reverse avec le même programme que celui précédemment évoqué. Par après, les produits PCR sont purifiés des impuretés résiduelles en les passant sur colonne microcon 100 (AMICON).

Grâce à la migration sur gel de quelques µl des différents produits PCR, nous estimons la quantité d'ADN se trouvant dans ces échantillons. A partir de ces résultats et sur base de la table 1 située en vis à vis, nous saurons quel quantité d'ADN devra être utilisé pour réaliser le mélange qui sera envoyé au séquençage. Ce dernier est composé de :

0,72µl d'amorce reverse ou forward (10 pM/µl)
 X µl d'ADN
 Porter à volume de 12 µl avec de l'eau déionisée stérile.

1.7. Mise en culture de nuit

La mise en culture de nuit permet de multiplier les clones bactériens, dont les inserts ont été caractérisés par le séquençage et que nous souhaitons préserver.

Protocole:

- Dans un tube de 14ml, mettre 4 ml de LB avec la tétracycline et l'ampicilline dans les quantités adéquates
- Ajouter stérilement la colonie bactérienne d'intérêt grâce à un embout
- Incuber à 37°C dans un agitateur « C24 Incubator Shake » (Edison, NJ-USA) durant une nuit.
- Centrifuger les tubes à 4000 g pendant 15 minutes.
- Enlever le surnageant
- Resuspendre les bactéries dans du glycérol 20% stérilisé par passage sur filtre de 0,22 µm (MILLEX^R-HA MILLIPORE)
- Stocker à -80°C dans un Tube cryo tubeTM vials (NUNC).

2. Alignement de séquences

- Choisir les séquences personnelles ou provenant de GENBANK
- Copier la séquence voulue dans DNA strider et convertir l'anti-parallèle quand cela s'impose
- Copier ces séquences et les importer dans Word
- Mettre: >NOM de la séquence (huit caractères maximum) puis à la ligne mettre la séquence. Les différentes séquences doivent être espacées par un saut de ligne. Retirer les espaces et les chiffres et autres caractères parasites
- Ouvrir <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multialign.html> et aligner la(es) séquence(s) à comparer en utilisant le programme Clustal w 1.7.
- La mise en évidence du consensus se fait en utilisant Boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) configuré avec :

Output format	RTF old
Font size	10
Consensus line	Consensus line with letters
Fraction of sequences	0,5
Input sequence format	Other

- Analyser les résultats.

3. Extraction d'ADN3.1. Avec GenElute Plant Genomic DNA kit (SIGMA)

Préparatifs

- préchauffer un bain à 65°C
- préchauffer la solution d'élution à 65°C

- préchauffer la "binding solution" à 65°C pour remettre le tout en solution. Laisser refroidir ensuite à température ambiante avant usage
- Diluer la solution de lavage concentrée d'un volume de 4 ml avec 9.5 ml d'éthanol 95%.

Protocole

1. **BROYAGE DE CELLULES:** Broyer les tissus végétaux en une fine poudre dans l'azote liquide. Transférer 100 mg de cette poudre dans un tube microcentrifuge de 1,5 ml. Garder ce tube sur glace
2. **LYSE DES CELLULES:** Ajouter 350 µl de solution de lyse partie A et 50 µl de solution de lyse partie B dans le tube. Vortexer et mélanger par inversion. Incuber la mélange à 65°C pendant 10 minutes en mélangeant occasionnellement
3. **PRECIPITATION DES DEBRIS:** Ajouter 130 µl de solution de précipitation dans le mélange. Mélanger en inversant et placer le tube sur glace pendant 5 minutes. Centrifuger le tube à vitesse maximum durant 5 minutes pour précipiter débris, protéines et polysaccharides
4. **FILTRAGE DES DEBRIS:** Pipeter doucement le surnageant de l'étape 3 et le placer sur une colonne de filtration GenElute. Centrifuger à vitesse maximale durant 1 minute. Cela permet d'éliminer les débris cellulaires qui ne l'ont pas été à l'étape 3
5. **PREPARATION POUR LA FIXATION:** Ajouter 700 µl de solution de fixation directement dans le liquide obtenu à l'étape 4. Mélanger en inversant
6. **FIXATION:** Pipeter doucement 700µl de la mixture de l'étape 5 et mettre sur une colonne "GenElute Nucleic Acid binding. Centrifuger à vitesse maximum pendant 1 minute. Eliminer l'éluat et garder le tube collecteur. Mettre le reste du mélange obtenu à l'étape 5 sur la colonne et centrifuger de nouveau
7. **LAVAGE:** Placer la colonne de l'étape 6 sur un tube de 2 ml. Mettre 500 µl de solution de lavage sur la colonne et centrifuger à vitesse maximale durant 1 minute. Eliminer le liquide au fond du tube mais garder ce dernier pour y replacer la colonne. Mettre 500 µl de solution de lavage et centrifuger à vitesse maximum durant 1 minute.
8. **Elution de l'ADN:** Transférer la colonne de fixation sur un nouveau tube de 2 ml. Placer 100 µl de solution d'élution préalablement chauffé à 65°C sur la colonne et centrifuger à vitesse maximum durant 1 minute. Réaliser l'élution deux fois. Les éluats peuvent être collectés dans le même tube. Alternativement, un autre tube peut être utilisé pour la seconde élution.

3.2. Avec TriPure Isolation Reagent (BOEHRINGER MENNHEIN)

Matériel requis, non fourni

- Chloroforme
- Ethanol 100%
- Ethanol 75%
- NaOH 8mM
- Citrate de sodium 0,1M dans du éthanol 10%

Protocole

- 1) Phase de séparation.

- Placer 100 mg de broyat de tissus broyés dans un tube de 2 ml, ajouter 1 ml de solution TriPure. Laisser incuber 5 minutes à température ambiante
- Ajouter 200 µl de chloroforme dans le tube. Mélanger vigoureusement durant 15 secondes
- Incuber à la température ambiante durant 10 à 15 minutes
- Pour séparer la solution en trois phases (phase organique, interphase, phase aqueuse), centrifuger le tube à 12 000 g durant 15 minutes à 4°C
- Après centrifugation, récupérer la phase se trouvant au fond du tube (celle colorée en rouge). C'est cette phase qui contient l'ADN.

2) Isolement de l'ADN.

- Ajouter à la solution 300 µl d'éthanol 100%. Mélanger en inversant
- Incuber le tube durant 3 minutes à température ambiante pour permettre à l'ADN de précipiter
- Centrifuger à 2000 g durant 5 minutes à 4°C
- Retirer le surnageant (il contient du phénol, de l'éthanol et des protéines)
- Ajouter dans le tube contenant le culot d'ADN, 1ml de citrate de sodium 0,1M. Laisser le tube à t° ambiante durant 30 minutes. Centrifuger le tube durant 5 minutes à 2000 x g à 4°C. Eliminer le surnageant. Réaliser cette étape deux fois
- Dans le tube contenant le culot d'ADN, ajouter 1,5 ml d'éthanol 75%
- Incuber le tube à température ambiante durant 10 à 20 minutes
- Centrifuger le tube à 2000 x g durant 5 minutes à 4°C
- Retirer le surnageant
- Passer le tube au speed-vac durant quelques minutes pour éliminer complètement l'éthanol
- Resuspendre l'ADN dans 300 à 600 µl de NaOH 8 mM.

3.3. Avec Nucleon "Extraction and purification plant tissue"

Transférer dans un tube en PET de 50 ml, 1 gramme de racine de *C. intybus* préalablement broyée dans l'azote liquide.

1) Lyse des cellules

- Ajouter 4,6 ml de réactif 1 (fourni par le kit) dans le tube
- Mélanger en inversant durant 2 minutes
- Ajouter 1,5 ml de réactif 2 (fourni par le kit)
- Mélanger en inversant jusqu'à ce qu'un mélange homogène soit obtenu
- Incuber dans un bain à 65°C durant 15 minutes en agitant le tube régulièrement
- Placer le tube sur glace durant 20 minutes
- Centrifuger à vitesse maximum pour culotter les débris et récupérer le surnageant.

2) Extraction d'ADN

- Ajouter au tube 2 ml de chloroforme préalablement stocké à – 20°C. Le chloroforme froid est plus efficace pour retirer les polysaccharides.
- Ajouter 200 µl de "Nucleon PhytoPure DNA extraction resin suspension". La résine permet de retenir les polysaccharides en se liant à eux de manière covalente

- Placer sur un rotor à 4°C durant 10 minutes
- Centrifuger à 1300 g durant 10 minutes à température ambiante
- Reprendre la phase située au dessus de la résine afin de la répartir dans des tubes de 2 ml
- Centrifuger ces tubes à 13000 g durant 5 minutes
- Récupérer le surnageant et le transférer dans des tubes de 1,5 ml
- Ajouter dans chaque tube qui contient à peu près 1 ml de solution, 300 µl de chloroforme froid et 30 µl de résine.
- Placer de nouveau les tubes sur un rotor à 4°C. Centrifuger à 1300 g durant 10 minutes
- Reprendre la phase située au dessus de la résine et la placer dans de nouveaux tubes de 1,5ml
- Réaliser quatre extractions phénol-chloroforme afin d'éliminer les protéines (voir point 3.5).

3) Précipitation d'ADN

- Ajouter 1 volume d'isopropanol stocké préalablement à -20°C
- Inverser le tube avec précaution jusqu'à la précipitation de l'ADN
- Centrifuger à un minimum de 8000 rpm durant 5 minutes pour culotter l'ADN
- Enlever le surnageant et ajouter 1 ml d'éthanol 70 % qui a été préalablement stocké à -20°C
- Centrifuger à 13000 rpm durant 5 minutes
- Enlever le surnageant, drainer
- Passer à l'évaporateur sous vide durant 5 minutes
- Resuspendre dans 200 µl d'eau millipore stérile.

Placer les tubes sur un rotor à 4°C durant toute une nuit pour permettre à l'ADN de se remettre en suspension. Terminer en réalisant éventuellement un traitement à la RNase suivi de plusieurs extractions phénol-chloroforme jusqu'à ce que les protéines soient complètement éliminées.

3.4. Traitement à la RNase

Un traitement à la RNase DNase free de l'échantillon contenant l'ADN génomique est préférable afin que celui-ci soit le plus pur possible.

La concentration de la RNase dans l'échantillon doit être de 10 µg par ml. Il faut ensuite incuber une heure à 37°C avant de réaliser une extraction phénol-chloroforme.

3.5. Extraction phénol-chloroforme

- Ajuster préalablement le volume des échantillons à 100 µl et la salinité à 250 mM sur base d'un tampon de digestion contenant 50 mM en NaCl
- Ajouter un volume de solution phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1)
- Mélanger en inversant. Laisser reposer après chaque agitation. Répéter cinq à six fois l'opération
- Centrifuger à 13000 rpm pendant 3 minutes à température ambiante
- Récupérer la phase aqueuse sans toucher l'interface (celle-ci contient les protéines)

- Si l'interface contient beaucoup de protéines, il se peut qu'il en reste encore dans la phase aqueuse. Une nouvelle extraction phénol-chloroforme sur cette dernière peut alors être réalisée afin de les éliminer complètement.
- Terminer par une précipitation à l'éthanol de l'ADN et resuspendre dans 20 μ l d'eau millipore stérile.

4. Recherche de promoteurs

Matériel utilisé: Universal GenomeWalker Kit (CLONTECH).

PROTOCOLE

4.1. Qualité de l'ADN génomique

Avant de commencer cette manipulation, un contrôle de la pureté de l'ADN génomique est nécessaire. Celui-ci est réalisé en faisant la digestion de l'ADN par l'enzyme de restriction Dra I.

- Dans un tube, réaliser le mélange suivant:

5 μ l	l'ADN génomique expérimental
1,6 μ l	Dra I
2 μ l	tampon de restriction 10 X pour Dra I
11,4 μ l	eau déionisée

- Mélanger avec précaution en inversant le tube. Ne pas vortexer afin de ne pas casser l'ADNg.
- Incuber à 37°C durant la nuit.
- Faire migrer 5 μ l de la réaction sur un gel d'agarose 1%. Une traînée doit apparaître, indiquant que l'ADN a été digéré par l'enzyme de restriction et que par conséquent, sa pureté est suffisante pour continuer.

4.2. Digestion de l'ADN génomique

Quatre digestions sur l'ADN génomique expérimental sont réalisées. Les quatre enzymes de restrictions utilisées sont DRA I, EcoRV, Stu I et Pvu II. Un contrôle positif a également été réalisé sur de l'ADN génomique humain avec Pvu II.

- Pour chaque réaction sur l'ADNg expérimental, réaliser le mélange suivant dans un tube séparé de 1,5 ml:

20 μ l	ADN génomique (25 μ g)
3,2 μ l	Enzyme de restriction (10 U/ μ l)
4 μ l	Tampon de l'enzyme de restriction correspondante
12,8 μ l	Eau déionisée

Pour le contrôle positif, réaliser le mélange suivant:

10	µl	ADNg humain
3,2	µl	Enzyme de restriction Pvu II
4	µl	Tampon d'enzyme de restriction Pvu II
22,8	µl	Eau déionisée

- Incuber à 37° C durant deux heures
- Vortexer la réaction à basse vitesse durant 5 à 10 secondes. Remettre à 37° C pour la nuit.
- Pour chaque réaction, faire migrer 2 µl sur un gel d'agarose 1 %. Continuer avec les tubes dont la digestion de l'ADNg a été complète.

4.3. Purification de l'ADNg

Pour chaque tube positif:

- Ajouter au 38 µl d'ADNg digéré, 68 µl d'eau stérile pour porter le volume à 100 µl
- Ajouter 1 volume de phénol (100 µl). Vortexer doucement durant 5 à 10 secondes. Centrifuger rapidement pour séparer les deux phases. Récupérer la phase aqueuse dans un nouveau tube
- Ajouter 1 volume de chloroforme (100 µl). Vortexer doucement durant 5 à 10 secondes. Centrifuger rapidement pour séparer les deux phases. Récupérer la phase aqueuse dans un nouveau tube
- Ajouter deux volumes (200µl) d'éthanol 95 % froid et 1/10 de volume (10 µl) de NaOAc 3M pH 4,5. Vortexer doucement durant 5 à 10 secondes. Centrifuger à 13000 rpm durant 10 minutes. Enlever le surnageant
- Laver le culot avec 100 µl d'éthanol 80 % froid. Centrifuger à 13000 rpm durant cinq minutes
- Enlever le surnageant. Passer à l'évaporateur sous vide durant cinq minutes
- Resuspendre le culot dans 20 µl de TE (Tris-HCl 10 mM EDTA 0,1mM) pH 7,5. Vortexer
- Migration d'1 µl d'ADNg purifié de chaque tube sur un gel d'agarose 1 %.

4.4. Ligation des adaptateurs

- Pour chaque tube, transférer 1,6 µl de l'ADNg digéré et purifié dans un tube de 0,5 ml. A chacun, ajouter le mélange suivant:

1,9	µl	GenomeWalker Adaptor (25 µM/µl)
0,8	µl	10X Ligation Buffer
0,5	µl	T4 DNA Ligase (6 units/µl)

- Incuber à 16° C durant la nuit
- Pour stopper la réaction, incuber à 70° C durant cinq minutes
- A chaque tube, ajouter 72 µl de TE (10/1, pH 7,4)
- Vortexer à basse vitesse durant 10 à 15 secondes

4.5. Amplification

Cette étape nécessite la réalisation d'une PCR imbriquée à l'aide de deux paires d'amorces : une paire externe et une paire interne. Deux contrôles négatifs et deux contrôles positifs sont réalisés durant les deux PCR.

PCR No 1 : amorces externes

- Préparer un mélange pour la PCR primaire qui servira pour chacune des 8 réactions:

360	µl	eau déionisée
45	µl	10X PCR Reaction Buffer
9	µl	dNTP (10 mM)
9	µl	Amorce 1 de l'adaptateur
9	µl	Taq polymerase (5U/µl)

432 µl Volume total

- Placer 48 µl de mélange de PCR primaire dans chaque tube.
- Pour les tubes correspondant à la recherche du promoteur du gène d'intérêt, ajouter:
 - 1 µl Amorce spécifique out
 - 1 µl Produit de ligation dilué 150 X
- Pour le tube correspondant au premier contrôle positif (à partir de l'ADNg humain digéré par Pvu II):
 - 1 µl Positive control tPA primer (PCP1)
 - 1 µl Produit de ligation dilué 150 X
- Pour le tube correspondant au deuxième contrôle positif:
 - 1 µl PCP1
 - 1 µl Pre-constructed control library
- Pour le tube correspondant au premier contrôle négatif:
 - 1 µl PCP1
 - 1 µl Eau déionisée
- Pour le tube correspondant au deuxième contrôle négatif:
 - 1 µl Amorce spécifique out
 - 1 µl Eau déionisée

Programme PCR utilisé:

Température (°C)	Temps	Nombre de cycle
94	25 "	7
72	3 '	
94	25 "	32
67	3 '	
67	7 '	1

- Analyser 8 µl des produits obtenus de la première PCR sur un gel d'agarose 1 %. Si aucun produit n'apparaît, il faut réaliser cinq cycles additionnels.

PCR No 2: amorces internes

- Mélange de la PCR secondaire pour chacune des réactions:

360 µl Eau déionisée
 45 µl 10 X PCR Buffer
 9 µl dNTP (10 mM)
 9 µl Amorce 2 de l'adaptateur
 9 µl Taq polymerase

- Ajouter 48 µl de Mélange dans chaque tube
- Ajouter 1 µl de produit PCR primaire correspondant dans chaque tube
- Pour les tubes correspondant à la recherche des gènes d'intérêts, mettre 1 µl d'amorces spécifiques IN
- Dans le tube correspondant au deuxième contrôle négatif, ajouter 1 µl d'amorce spécifique IN
- Dans les tubes correspondant aux deux contrôles positifs et au premier contrôle négatif, ajouter 1 µl de "positive control tPA Nested primer" (PCP2).
- Utiliser le même programme pour la PCR secondaire que celui utilisé pour la PCR primaire
- Faire migrer 5 µl du produit PCR secondaire sur un gel d'agarose 1 %

Si il y a eu amplification des fragments d'intérêt, ces derniers peuvent être clonés dans PCR II afin d'être séquencés.

5. Dosage des acides nucléiques au spectrophotomètre

1.2. Principe

Les acides nucléiques absorbent les ultra-violets à une longueur d'onde de 260 nm. Une unité de densité optique (DO) correspond à une concentration connue en ADN. Il est donc possible de calculer la concentration en acides nucléiques d'une solution grâce à sa DO.

$$1 \text{ unité DO} = 50 \mu\text{g}/\mu\text{l d'ADN}$$

5.2. Dosage

- Régler le spectrophotomètre en réalisant une ligne de base comprise entre 220 et 300nm
- Régler le zéro de l'appareil en utilisant 1 ml d'eau déionisée
- Diluer 5 μl d'acide nucléique à doser dans les 1 ml d'eau déionisée et mélanger la cuvette par inversion
- Mesurer l'absorbance de l'échantillon de 260 nm à 280 nm au moyen d'une cuvette en quartz
- Mesurer ensuite l'absorbance à 280 nm pour doser les protéines.

Le rapport des absorbances à 260 et 280 nm permet de vérifier la pureté de l'ADN. La qualité de ce dernier est considérée comme bonne quand le rapport 260/280 arrive aux alentours de 1,60.

6. RT-PCR semi-quantitative

6.1. Mix PCR

Pour un volume total de 50 μl :

36,3	μl	Eau déionisée
5	μl	Tampon 1 10X
5	μl	ADNc
1	μl	dNTP
1	μl	Amorce gauche (100 pM)
1	μl	Amorce droite (100 pM)
0,7	μl	Expand long template DNA polymerase (3U/ μl)

6.2. Programme PCR

Température (en °C)	Temps (en minutes)	Nombre de cycles
94	10	1
94	1	40
55	1	
72	1	
94	7	1

6.3. Protocole de quantification des acides nucléiques dans un gel d'agarose

Les gels d'agarose colorés au bromure d'éthidium ont été analysés au moyen d'un appareil fluor imager (BioRad). Cette analyse permet la quantification des amplifications obtenues par RT-PCR au moyen du programme Fluor S-max imager Quantity one (Biorad). Celui-ci permet de calculer l'intensité d'une bande de gel tout en éliminant le bruit de fond propre à chaque gel autorisant la comparaison des intensités des bandes issues de gels différents.

Méthode

- Placer les objectifs adéquats au niveau de la caméra (lentille de zoom: f-4; lentille 50mm : f-2.8 et filtre 250 LP)
- Placer le gel sur le plateau, mettre au point et régler le grossissement
- Acquérir l'image
- Ouvrir le programme Quantity One
- Sélectionner les bandes d'intérêt à quantifier en utilisant un rectangle de même surface. Faire de même pour les bandes de Smart Ladder en les désignant comme standard
- Sélectionner le reste du gel en le désignant comme "Background". Le bruit de fond est ainsi pris en considération
- Quantifier les bandes sélectionnées avec les unités choisies
- Les données sont sauvegardées sous format Excel pour analyse et traitement ultérieurs.

6. AP-PCR

6.1. Principe

L'AP-PCR permet d'amplifier des fragments d'ADN génomique à l'aide d'une seule amorce. Un premier cycle à une température d'hybridation élevée est réalisé afin que l'amorce aille s'hybrider sur l'ADNg de manière spécifique. Ensuite, la température est abaissée à 37°C : l'amorce s'hybride à un endroit non spécifique en amont du fragment à amplifier. Ensuite, la PCR reprend un schéma classique en augmentant de nouveau la température d'hybridation à une valeur plus spécifique.

6.2. Mélange PCR

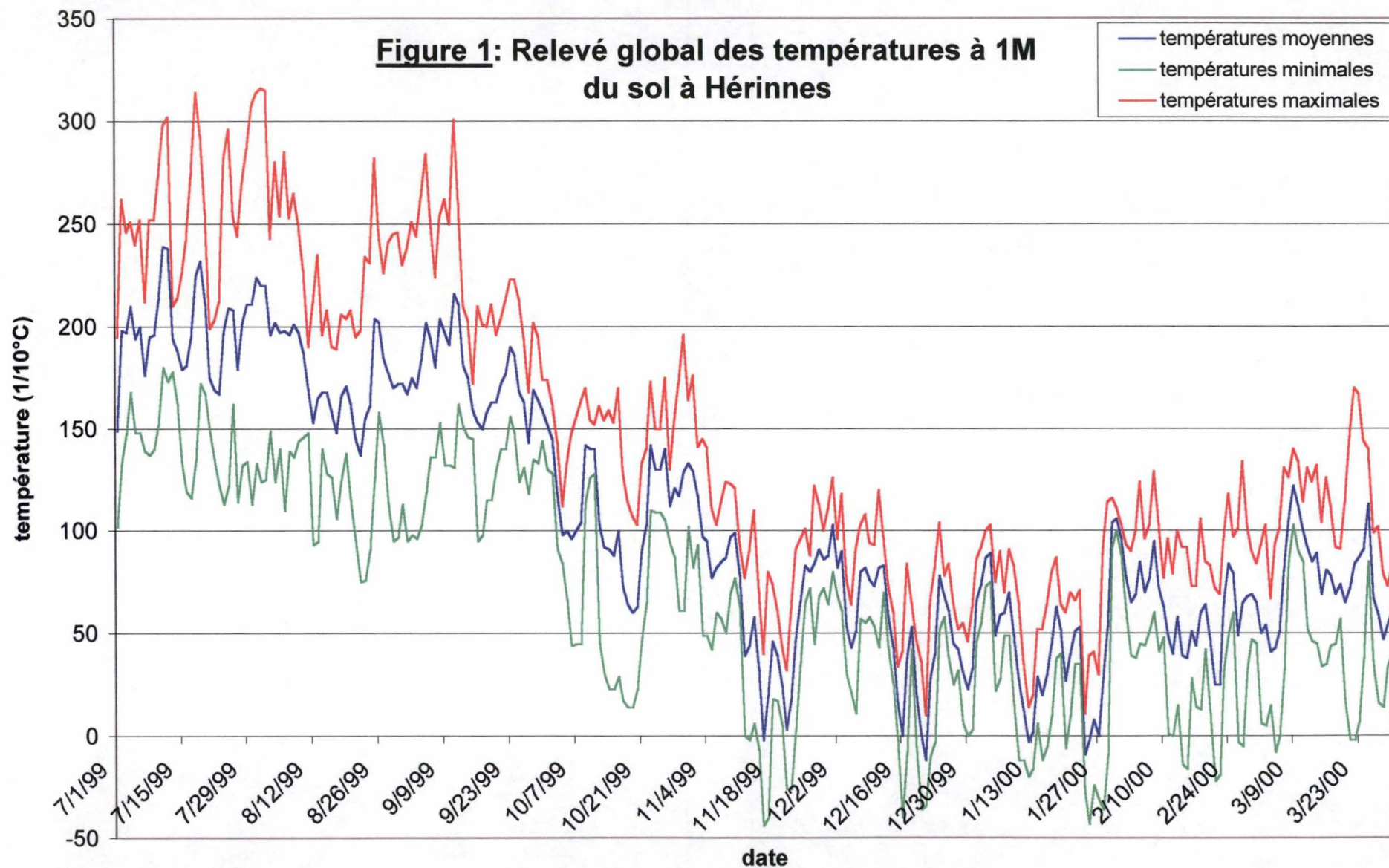
Dans un tube, réalisé le mélange suivant (volume total de 50 µl) :

- 5 µl Tampon PCR 10X
- 1 µl dNTP
- 1 µl Amorce spécifique (100 pM)
- 1 µl ADN génomique
- 0,4 µl Taq polymérase
- 41,6 µl Eau déionisée

6.3. Programme PCR

Température	Temps	Nombre de cycle
94°C	10 min.	1
50 à 65°C	1 min.	1
72°C	20 min.	
37°C	5 min.	
94°C	1 min.	40
50 à 65°C	1 min.	
72°C	1 min.	
72°C	10 min.	1
10°C	infinite	1

III. Résultats et Discussion



1. Recherche d'isoformes d'invertases

1.1. Matériel utilisé

Les racines de chicorée utilisées pour ce mémoire ont été prélevées en champs à Hérinnes et plongées immédiatement dans l'azote liquide. Les prélèvements ont été réalisés toutes les deux semaines entre le 27 juillet 1999 et le 25 janvier 2000 (Tableau 1). Ensuite, une extraction d'ARNm a été réalisée sur chacun de ces 14 prélèvements.

Prélèvement No	Date
1	27/07/99
2	10/08/99
3	24/08/99
4	07/09/99
5	21/09/99
6	05/10/99
7	19/10/99
8	02/11/99
9	16/11/99
10	30/11/99
11	14/12/99
12	28/12/99
13	11/01/00
14	25/01/00

Tableau 1 : date des prélèvements

Un relevé global de température (Figure 1) a également été demandé à l'IRM (Institut Royal Météorologique). La première fois où la température minimale se situe en dessous de 0° C est observée un peu avant le 18 novembre 1999. Cette date correspond au neuvième prélèvement.

Nous définirons donc les huit premiers échantillons d'ARNm comme étant ceux avant le coup de froid et les suivants comme ceux situés après cette baisse de température.

1.2. Objectifs et procédure

L'objectif de cette première partie de mémoire est de rechercher différentes isoformes d'invertases afin d'établir leur distribution dans les différents prélèvements et ainsi, de réaliser une comparaison entre échantillons avant et après la baisse de température.

Pour ce faire, nous avons d'abord réalisé une RT-PCR sur les ARNm de certains prélèvements avec des amorces dégénérées afin d'amplifier un grand nombre de fragments d'isoformes d'invertases. Les fragments ont ensuite été insérés dans le vecteur PCR II qui a servi à transformer les bactéries TOP 10 F'. De cette manière, on a pu isoler un seul fragment d'invertase à la fois afin de pouvoir le séquencer et l'analyser.

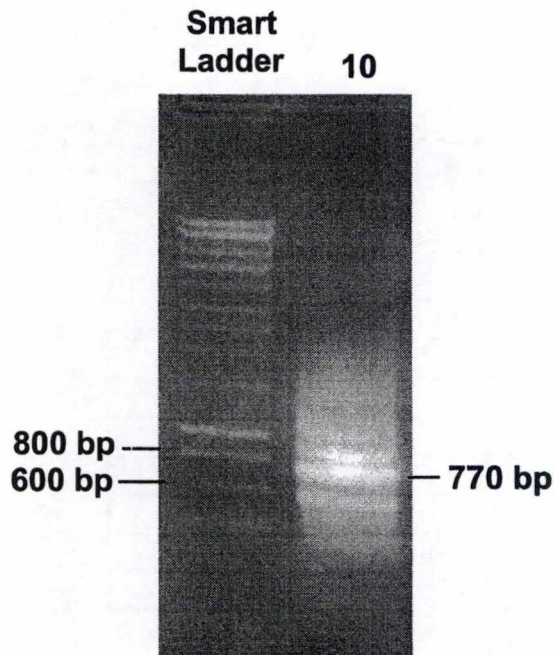


Figure 2: Amplification de fragments d'invertases à partir de l'ADNc provenant de l'échantillon 10 avec les amorces invgotch et invdrwa (100 pM).

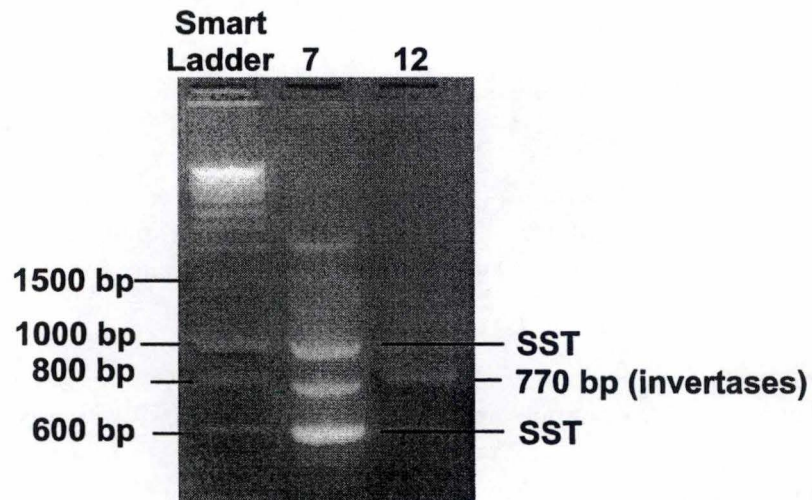


Figure 3: Amplification de fragments d'invertases à partir de l'ADNc des échantillons 7 et 12 avec les amorces invgotch et invdrwa (100 pM).

1.3. Recherche d'isoformes sur les échantillons 7, 10 et 12

1.3.1. RT-PCR

Une RT-PCR est d'abord réalisée sur l'échantillon 10 afin de vérifier le bon fonctionnement du programme mis au point préalablement par le laboratoire.

Les amorces utilisées sont nommées Invgotch et Invdrwa.

Invgotch : 5'-YTG-GAT-GAA-CGA-TMC-NAA-YGG-W-3'

Invdrwa : 5'-TCR-WAR-AAY-GWC-TTK-GAW-CGA-TA-3'

Ce sont des amorces dégénérées. Elles ont été réalisées sur base de séquences conservée d'invertases d'espèces différentes. Elles permettent l'amplification de nombreuses isoformes d'invertases de chicorée. Les amplicons ainsi générés ont une longueur de plus ou moins 770 paires de bases. L'endroit où ces amorces s'hybrident est montré en annexe 3.

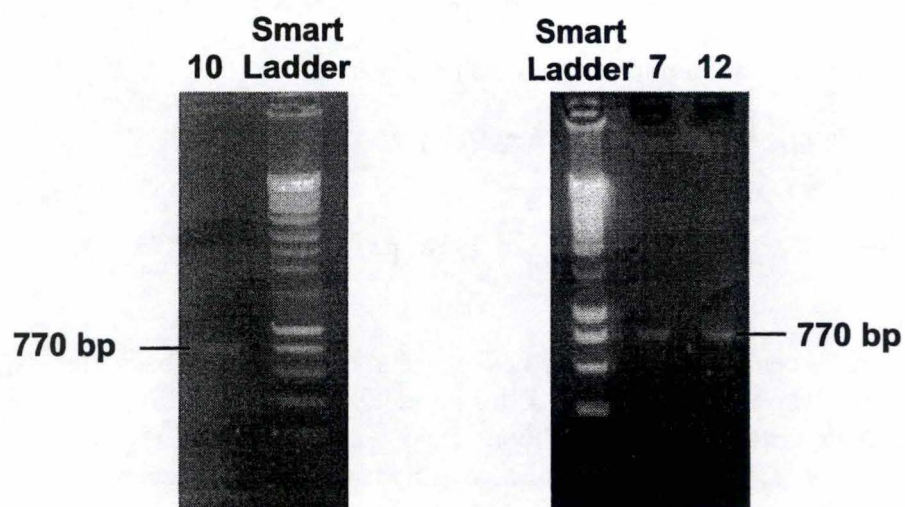
La figure 2 montre le résultat de l'amplification sur l'échantillon 10. On retrouve notre bande d'intérêt à 770 bp. Cependant, d'autres bandes (à 980 et 400 bp) sont observables de part et d'autre de ce fragment : ce sont des amplicons d'ADNc de SST, les enzymes responsables de la première étape de synthèse des fructanes. Pour rappel, ces molécules montrent 33 à 38 % d'identité du point de vue des séquences nucléotidiques avec nos invertases. Il n'est donc pas étonnant que celles-ci soient également amplifiées.

Par la suite, deux autres RT PCR ont été réalisées sur les échantillons 7 (19/10/1999) et 12 (28/12/1999) (Figure 3). Les profils obtenus montrent déjà une différence entre échantillons : Les bandes de SST ne sont plus présentes au niveau de la piste représentant l'échantillon 12. Enfin, la quantité de fragments amplifiés d'invertases varie également.

Les trois bandes d'intérêts à 770 bp des échantillons 7, 10 et 12 sont découpées et ensuite purifiées sur le kit ULTRA FREE DA (Millipore). Une concentration sur microcon 100 est également réalisée afin d'obtenir 20 µl de fragments purifiés de chacun des prélèvements. Quelques µl sont mis sur gel d'agarose 1% (Figures 4 et 5) afin d'estimer la quantité d'amplicons totale. Les résultats sont repris dans le tableau 2.

Echantillon No	Quantité mise à migrer	Estimation de la quantité par µl	Quantité totale
7	3 µl	10 ng	200 ng
10	2 µl	25 ng	500 ng
12	3 µl	10 ng	100 ng

Tableau 2: estimation de la quantité d'amplicons dans les différents échantillons.



Figures 4 et 5: Fragments d'invertases de 770 bp purifiés provenant des échantillons 7, 10 et 12.

1.3.2. Clonage

Ligation

La ligation des inserts s'est faite dans le vecteur PCR II (Invitrogen), vecteur ayant l'avantage de ne pas se refermer sur lui-même. Un schéma de ce vecteur se trouve à la figure 6.

La ligation a été réalisée en utilisant un rapport insert/vecteur de 5. Sachant que nous engageons dans la réaction 50 ng d'un vecteur (PCR II) d'une taille de 3,9 Kb, 50 ng d'insert de 770 bp ont donc dû être utilisés pour chacune des réactions de ligation.

Ligation 7 : 4 µl d'amplicon 7 purifié

Ligation 10 : 2 µl d'amplicon 10 purifié

Ligation 12 : 4 µl d'amplicon 12 purifié

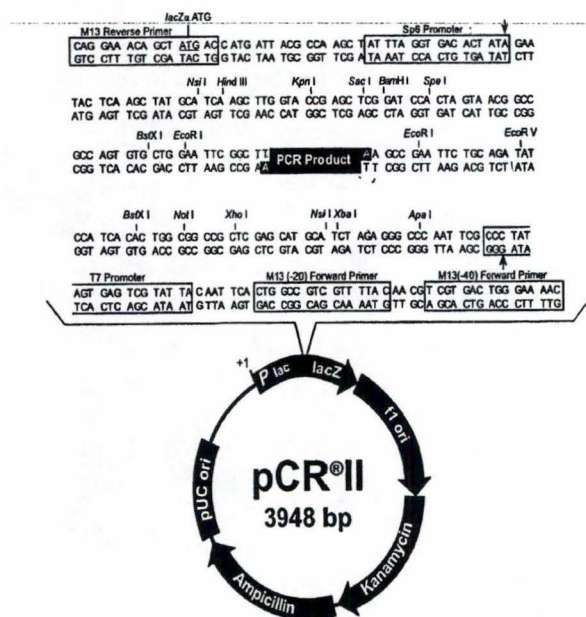


Figure 6 : Vecteur PCR II (Invitrogen).

Transformation

Les bactéries TOP 10 F' thermocompétentes (Invitrogen) ont été transformées avec les vecteurs PCR II contenant les inserts d'invertases.

L'étalement de respectivement 50 et 100 µl de bactéries pour chaque transformation (une transformation par produit de ligation) s'est fait sur des boîtes de LB agar Amp⁺ et Tet⁺. Les colonies blanches obtenues sont considérées comme positives, c'est à dire qu'elles contiennent théoriquement le vecteur avec le fragment d'invertase.



Figure 7: Vérification de la présence de l'insert de 770 bp provenant de l'échantillon 7 dans le vecteur PCR II des colonies positives. Les amorces utilisées sont forward et reverse.

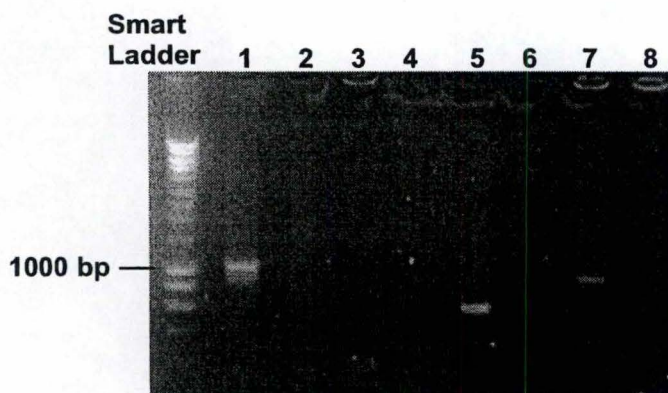


Figure 8: Vérification de la présence de l'insert de 770 bp provenant de l'échantillon 12 dans le vecteur PCR II des colonies positives. Les amorces utilisées sont forward et reverse.

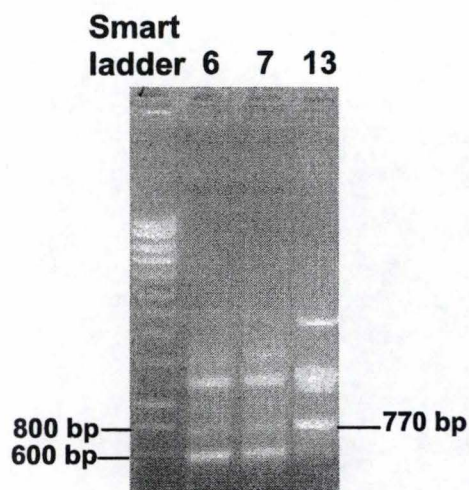


Figure 9: Amplification des fragments d'invertases des échantillons 6, 7 13 à partir des amorces Invgotch et Invdrwa.

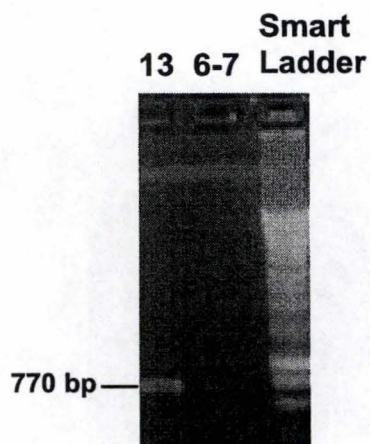


Figure 10: Estimation de la quantité des fragments d'invertases de 770 bp.

Résultats :

- La première transformation avec la ligation 10 n'a pas fonctionné : les bactéries n'ont pas poussé. Plusieurs hypothèses peuvent être retenues pour expliquer cette absence de colonies. Premièrement, le produit de ligation n'a pas été utilisé directement : il a été placé à -20°C durant tout un week-end. Les vecteurs auraient pu se casser suite à cette congélation. Deuxièmement, durant l'incubation à 37°C lors de la dernière étape de la transformation, les bactéries peuvent s'être déposées dans le fond du tube. Peu de bactéries ont alors été étalées.
- Les transformations 7 et 12 ont bien fonctionné. Elles ont été réalisées à partir de produit de ligation frais. Un repiquage des colonies blanches a été effectué et a permis d'isoler 15 clones de chaque transformation.

Criblage

Le but du criblage est de vérifier la présence de l'insert dans le vecteur des bactéries positives. Pour ce faire, une PCR sur les colonies blanches repiquées a été réalisée avec les amorces M13 forward et M13 reverse, oligonucléotides allant s'hybrider à quelques dizaines de paires de bases de part et d'autre de l'insert comme on peut le voir sur la figure 6. Les fragments attendus seront donc de l'ordre de 1030 bp.

Le criblage réalisé sur les clones positifs contenant normalement des inserts provenant de l'échantillon 7 et de l'échantillon 12 est montré en figures 7 et 8. Seules les colonies 7.7 (le premier chiffre désigne l'échantillon d'où provient l'insert, le deuxième chiffre représente la colonie criblée) et 12.1 ont effectivement le fragment de 770 bp intégré dans leur vecteur.

1.4. Recherche d'isoformes des échantillons 6 et 7

1.4.1. RT-PCR

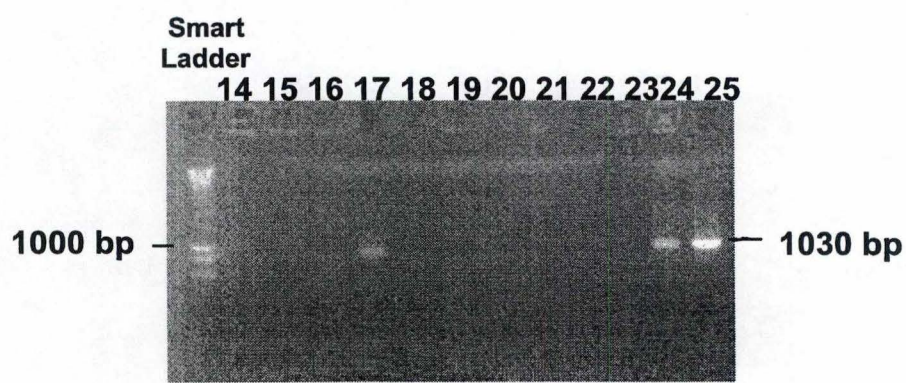
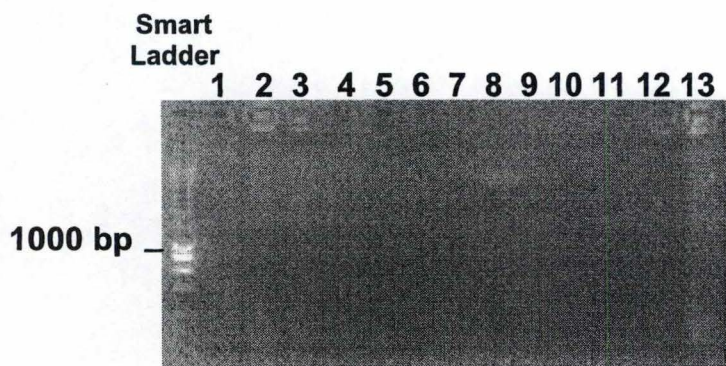
Suite à ces différents problèmes, trois nouvelles RT-PCR sur les échantillons 6 (5 octobre), 7 (19 octobre) et 13 (11 novembre) ont été réalisées. Les résultats pour ces dernières sont montrés en figure 9.

La manière de procéder est la même que précédemment. Cependant, les ADNc purifiés des échantillons 6 et 7 ont été couplés car ces derniers ne se trouvaient pas en concentration suffisante pour être clonés séparément.

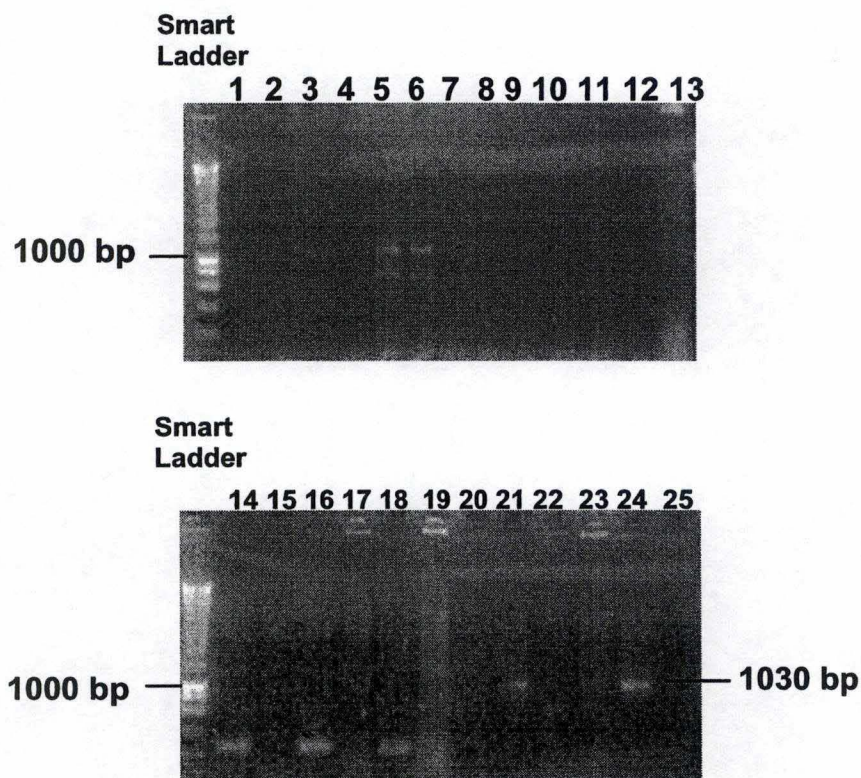
Une estimation de quantité d'amplicons (voir tableau 3) dans chaque échantillon a été calculée à partir de la figure 10 où l'on montre la migration de $3\text{ }\mu\text{l}$ d'ADNc purifiés 6-7 et 13.

Echantillon	Quantité par μl	Quantité totale
6-7	7 ng	140 ng
13	14 ng	280 ng

Tableau 3: estimation de la quantité d'amplicons des différents échantillons.



Figures 11 et 12: Vérification de la présence de l'insert de 770 bp provenant des échantillons 6 et 7 dans le vecteur PCR II des colonies positives. Les amorces utilisées sont M13 forward et M13 reverse.



Figures 13 et 14: Vérification de la présence de l'insert de 770 bp, provenant de l'échantillon 13, dans le vecteur PCR II des colonies positives. Les amorces utilisées sont M13 forward et M13 reverse.

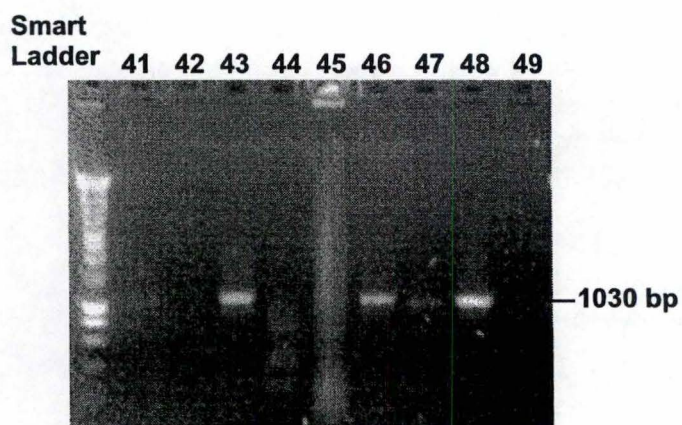
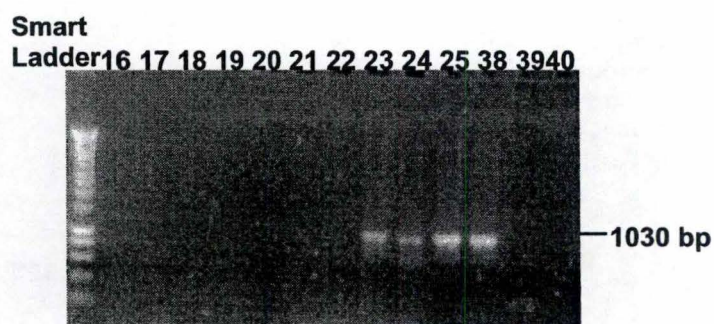
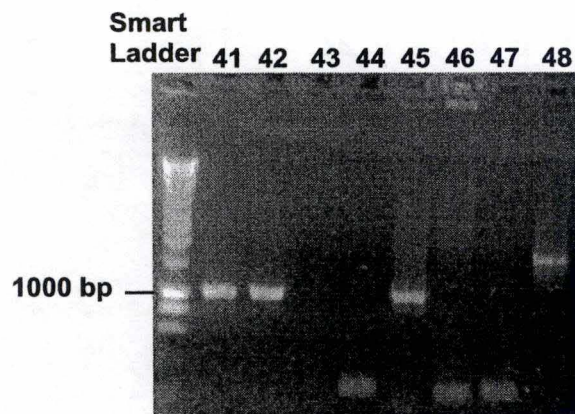
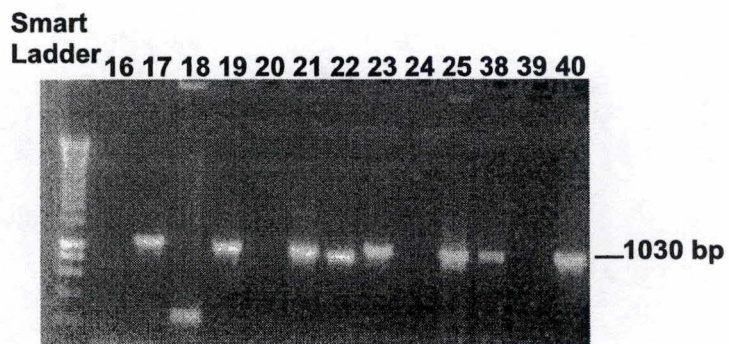


Figure 15. 16 et 17: Vérification de la présence de l'insert de 770 bp provenant des échantillons 6 et 7 dans le vecteur PCR II des colonies positives. Les amorce utilisées sont forward et reverse.



Figures 18. 19 et 20: Vérification de la présence de l'insert de 770 bp provenant de l'échantillon 13 dans le vecteur PCR II des colonies positives. Les amorces utilisées sont forward et reverse.

1.4.2. Clonage 2

Ligation

La ligation est toujours réalisée dans PCR II.

Clonage

Aucun problème de clonage : beaucoup de colonies positives sont obtenues pour les deux transformations, l'une avec PCR II contenant les inserts des échantillons 6 et 7, l'autre avec PCR II contenant les inserts de l'échantillon 13. 50 clones de chaque transformation ont pu être repiqués.

Criblage

Les résultats du criblages montrés en figures 11, 12, 13 et 14 nous font constater une fois de plus que peu de colonies potentiellement positives contiennent notre insert d'intérêt.

Une explication de ce manque d'efficacité proviendrait peut être du fait que trop de bactéries sont utilisées comme matrice pour la PCR de criblage. En effet, le volume du mélange PCR dans chaque tube est de seulement 5 µl. Or, beaucoup de matériel peut être pris lorsqu'on prélève des bactéries provenant de colonies repiquées. Il se peut qu'un excès de bactéries présente un effet inhibiteur sur les composants de la PCR.

Un autre criblage est alors fait toujours sur les colonies contenant les inserts 6-7 et les inserts 13 mais tout en veillant bien à réduire au maximum la quantité de bactéries utilisées. Les résultats obtenus (figures 15 à 18) montrent que beaucoup plus de clones s'avèrent contenir l'insert de taille attendue. Un excès de bactéries peut induire un effet inhibiteur sur la réaction d'amplification.

Certaines bandes ont par contre soit une taille plus grande que celle attendue (en piste 33 de la figure 13, par exemple), soit une taille légèrement plus petite (en piste 22 de la figure 17). Elles peuvent correspondre à des contaminations par la SST. Il peut également s'agir de produits de dégradation de bandes plus grandes. Ces clones négatifs n'ont pas fait l'objet d'investigations complémentaires.

1.4.3. Séquençage

Trente trois inserts ont été envoyées au séquençage. Parmi ceux-ci, 31 ont pu être utilisés et alignés : 8 provenaient des échantillons 6 et 7, et 23 du prélèvement 13. Deux clones ont été écartés car ils correspondaient à des SST.

Les séquences ont pu être alignées grâce à Clustal w avec, premièrement, des séquences d'invertases de *C. intybus* se trouvant dans les banques de données. Elles sont nommées Y11124 et Y11176 et ont été publiées en 1997 par le laboratoire de P. Van Cutsem. Mais ces séquences ont également été comparées avec neuf autres isoformes d'invertases

(CiFr01 à CiFr09) isolées par Nicolas Dauchot, tuteur de ce mémoire. Ces séquences ont été obtenues à partir des échantillons 3 et 10. A noter que CiFr09 correspond à Y11176.

Huit isoformes différentes ont été trouvées à partir des 33 séquences de départ. Les alignements sont présentés en annexe 6. Parmi ces huit séquences, quatre ne correspondent ni aux invertases présentes dans les banques de données, ni aux invertases trouvées dans les échantillons 3 et 10 : elles sont nommées CiFr10 à CiFr13. Les distributions relatives des 8 isoformes se trouvent en tableau 4.

Nom de l'isoforme	Nombre de clones isolés des échantillons 6 et 7	Nombre de clones isolés des échantillons 13
CiFr02	1	7
CiFr05	4	2
CiFr06	3	3
CiFr09	0	3
CiFr10	0	4
CiFr11	0	2
CiFr12	0	1
CiFr13	0	1
Total	8	23

Tableau 4 : distributions relatives des isoformes d'invertases dans les échantillons 6-7 et 13.

La figure 22 montre un graphique représentant le pourcentage d'isoformes trouvées respectivement dans les prélèvements 3, 6-7, 10 et 12 :

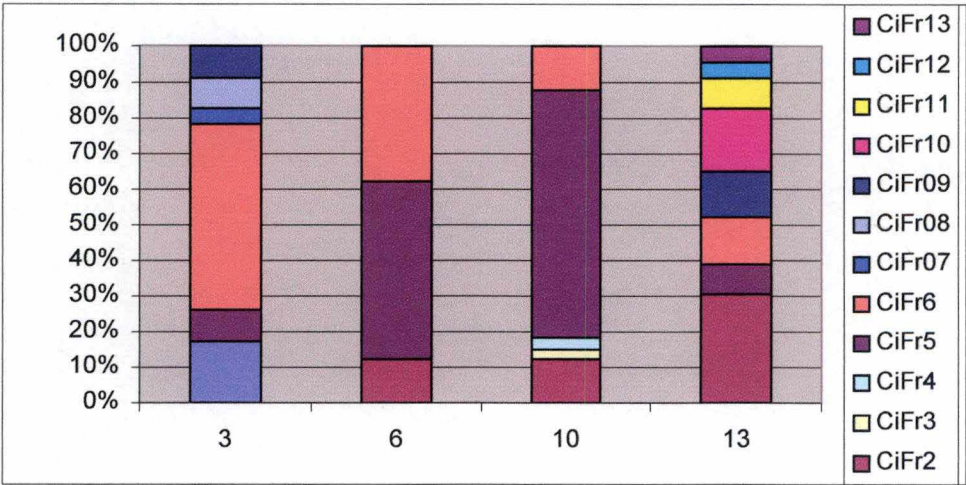


Figure 22 : Histogramme de fréquence des clones d'invertases sélectionnés aléatoirement dans les banques d'ADNc réalisées au départ des différents prélèvements de racines de chicorée effectués en 1999 à Hérinnes, près de Warcoing.

1.5. Discussion

La première conclusion au vu de nos résultats, mais également de ceux obtenus à partir des échantillons 3 et 10, est qu'il y a un grand nombre d'invertases différentes et qu'elles n'ont peut-être pas la même fréquence de distribution d'un échantillon à l'autre.

Cependant, il est impossible de comparer les échantillons entre eux car le nombre de clones analysés pour chacun des prélèvements est insuffisant pour assurer un échantillonnage valable et comparable au sein de chacune des populations de fragments amplifiés. Par ailleurs, nous n'avons aucune garantie quant à la représentativité de la banque amplifiées.

En analysant les résultats obtenus avec les échantillons 3 et 10, on peut constater que CiFr06 est largement dominant dans l'échantillon 3, alors qu'il est peu présent dans les échantillons après la baisse de température. Trois des huit séquences trouvées au niveau des échantillons 6 et 7 correspondent d'ailleurs à cette isoforme. Il se pourrait qu'elle soit spécifiquement exprimée avant la baisse de température. L'observation inverse est faite pour CiFr05, qui est présente surtout après le coup de froid, dans l'échantillon 10. Cette isoforme présente en fait 98 % d'identité avec la séquence de la FEH-1 de *C. intybus* publiée en 2000 par Van den Ende. Cette protéine, pour rappel, est présente lors du stockage à basse température (1°C). Les résultats obtenus avec l'ARNm des prélèvements 3 et 10 rejoindraient donc les résultats obtenus publiés. Cependant, 4 séquences de CiFr05 sur 8 au total se retrouvent dans les échantillons 6 et 7 contre seulement 2 sur 23 pour l'échantillon 13 (Tableau 4). Ce qui nonobstant les réserves mentionnées au paragraphe précédent, pouvait suggérer une contradiction avec les observations pour les échantillons 3 et 10.

Nous avons travaillé avec des amorces dégénérées construites sur base de séquences d'autres espèces. Nous ne pouvons donc pas affirmer que ces amorces vont s'hybrider avec la même efficacité sur toutes les isoformes : elles pourraient aller s'hybrider plus facilement sur certaines séquences et moins sur d'autres. Les fréquences de clones présentées dans l'histogramme de la figure 22 ne peuvent donc absolument pas être considérées comme représentatives des niveaux de transcrits des gènes d'invertases exprimés dans la racine.

En résumé, nous devons donc être particulièrement prudent avant d'affirmer qu'une isoforme est spécifique d'un état physiologique de la plante, consécutif à une baisse de température. Premièrement les données ne sont pas quantitatives car les banques amplifiées ne sont pas représentatives et le nombre de séquences obtenues par prélèvements n'est pas assez élevé. Deuxièmement, nous ne sommes pas sûr d'avoir pu amplifier toutes les séquences connues d'invertases et ce, avec la même fréquence. Enfin, nos données ne recouvrent pas tous les prélèvements.

En réalisant une RT-PCR semi-quantitative par la suite, certains de ces problèmes ont pu être résolus : nous avons ainsi pu étudier l'expression d'une seule isoforme à la fois dans les 14 prélèvements, permettant une comparaison entre ceux-ci.

2. Recherche de promoteurs

2.1. Choix des isoformes et procédure

Notre recherche de promoteur s'est faite sur deux isoformes : CiFr02 et CiFr06. CiFr02 est l'isoforme dont on a trouvé le plus de fragments (9 sur 31), principalement dans les échantillons prélevés après le coup de froid. Par logique, notre choix s'est ensuite porté sur une isoforme qui semblait spécifique du stage physiologique précédant la baisse de température, c'est à dire CiFr06.

Après avoir réalisé une extraction d'ADN génomique, nous avons utilisé le kit GenomeWalker (Clontech) afin de rechercher les promoteurs de nos séquences d'intérêts. Par la suite, une autre technique, l'AP-PCR, a également été testée.

2.2. Extraction d'ADN génomique

2.2.1. Introduction

Afin d'avoir la séquence du promoteur de nos isoformes, l'obtention d'une ADNg de *C. intybus* de qualité a été indispensable.

La première contrainte est venue du fait qu'il nous fallait une quantité suffisante d'ADNg pour la méthode GenomeWalker. De plus, cet ADN devait être très pur pour que les digestions par les différentes enzymes de restriction utilisées dans la première étape de cette méthode fonctionnent. Enfin, un gros problème était que le matériel mis à notre disposition était constitué de broyats de racines de chicorée et non de broyats de feuilles. Or, les racines contiennent beaucoup plus de protéines et de polysaccharides que les feuilles. La purification d'ADNg avec ce premier type d'organe est donc plus difficile.

2.2.2. Par la méthode Tripure

Le kit Tripure (Boehringer Mannheim) a été utilisé afin d'extraire de l'ADN génomique de *C. intybus* à partir de tissus broyés dans de l'azote liquide. Ce matériel est le même que celui dont nous nous sommes servis pour l'extraction de nos ARNm.

La méthode Tripure permet, en théorie, de purifier l'ADN, l'ARN et les protéines contenus dans des tissus animaux ou végétaux en séparant successivement la solution obtenue en trois phases.

Cependant, aucun ADNg ne fut détecté après migration sur gel d'un aliquote de l'échantillon final. En fait, lors de l'isolement de l'ADN, il était très difficile d'obtenir un culot adhérent bien à la paroi du tube en verre malgré l'augmentation de temps et de vitesse de rotation lors des différentes étapes de centrifugation. Bien que cette méthode soit généralement conseillée pour l'isolement d'ARN messenger, elle ne semble pas convenir, pour notre matériel, à l'extraction d'ADN. Une méthode plus spécifique est donc préférable.

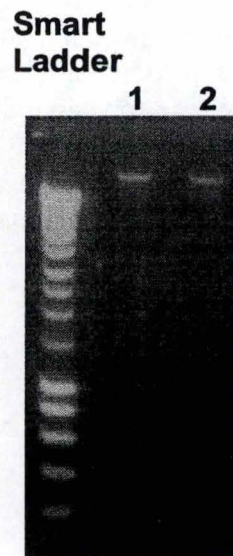


Figure 23: Estimation de la quantité d'ADN génomique de *C. intybus* (2 échantillons) purifié à l'aide du kit GenElute.

2.2.3. Par la méthode GenElute (SIGMA)

Cette méthode consiste en une lyse des cellules, suivie d'une élimination des débris. L'originalité provient de la fixation de l'ADN sur colonne qui pourra ensuite être récupéré à l'étape finale par élution.

La figure 23 montre la migration de 10 μ l d'ADNg sur les 200 μ l obtenus pour chaque échantillon (deux en tout). Cela prouve l'intégrité de notre ADNg. L'estimation de la quantité est de 2 ng/ μ l. Nous avons donc un total de 800 ng d'ADN à notre disposition. Mais, cette méthode souffre de deux principales limites : d'abord, nous ne pouvons travailler qu'avec de petites quantités de broyat de racines (100 mg). Ensuite, la quantité finale d'ADNg pour ces 100 mg de tissus de départ est assez faible, en tout cas insuffisante pour la méthode GenomeWalker qui demande 2,5 μ g d'ADNg pour chaque digestion de 100 μ l.

2.2.4. Par la méthode Nucleon

Le kit nucleon a la particularité d'utiliser une résine permettant de lier de façon covalente les polysaccharides et, ainsi de les éliminer facilement. Cette technique offre également l'avantage de pouvoir travailler avec une grande quantité (un gramme) de racine broyée.

Le protocole (voir matériel et méthode p10) a dû faire l'objet de certaines modifications de notre part. La raison en est que nous faisons une extraction sur racines de chicorée contenant beaucoup plus de polysaccharides et de protéines que les feuilles. Or, les protocoles standards, même adaptés aux tissus végétaux, sont dans la plupart des cas optimisés pour le travail sur feuilles. Aussi avons nous rajouté une centrifugation après les 20 minutes sur glace (durant l'étape de lyse des cellules) afin de culotter tout les débris cellulaires. Ensuite, nous avons réalisé un second passage sur résine, vu la quantité très élevée de sucres présents. Enfin, quatre extractions phénol-chloroforme ont été ajoutées avant l'étape de précipitation afin d'éliminer le plus de protéines possible. L'extraction a été réalisée sur quatre répliquats en parallèle. Au terme des manipulations, nous avons obtenu quatre échantillons (nommés respectivement C1, C2, C3 et C4) contenant chacun 100 μ l d'ADNg.

Les solutions d'ADNg ont ensuite subi trois vérifications :

- Pureté de l'ADN : passage au spectrophotomètre et comparaison des absorbance obtenues respectivement à 260 nm (ADN) et 280 nm (protéines).

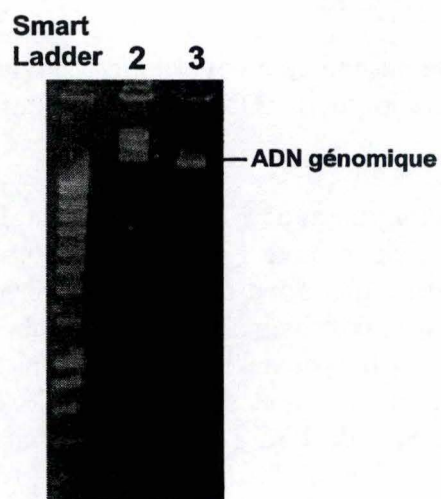


Figure 24: Estimation de la quantité d'ADN génomique purifié des échantillons 2 et 3.

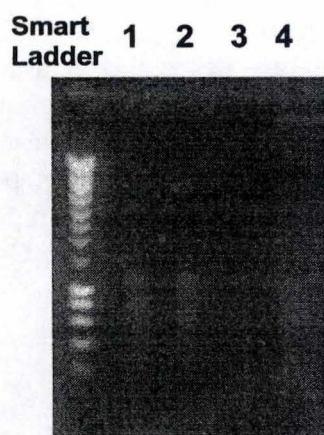


Figure 25: Digestion par l'enzyme de restriction Dra I de l'ADN génomique de *C. intybus* (4 échantillons) purifié à l'aide du kit Nucleon.

Résultats :

Tubes	Abs. à 260 nm	Abs. à 280 nm	Rapport de DO
C1	0,085	0,068	1,25
C2	0,106	0,066	1,60
C3	0,069	0,043	1,60
C4	0,072	0,049	1,46

Tableau 5 : Rapport de DO des ADNg de *C. intybus*.

Les tubes C2 et C3 ont un rapport de DO satisfaisant (voir tableau 5), indiquant une pureté suffisante de l'ADN.

-Intégrité de l'ADNg et quantification : Les échantillons C2 et C3 étant les plus intéressants, leur intégrité et quantité en ADNg a été estimée en faisant migrer 2 µl/100 de chaque tube sur gel d'agarose 1 % (Figure 24).

Résultats :

Tubes	Quantité d'ADN dans 1µl	Quantité totale
C2	300 ng	30 µg
C3	50 ng	50 µg

Tableau 6 : estimation de la quantité d'ADNg par échantillon

Remarque: la quantité d'ADNg n'a pas pu être estimée en utilisant le spectrophotomètre car cette mesure a été réalisées avant la digestion à l'ARNase.

-Digestion par l'enzyme de restriction Dra I: Une digestion a été faite sur les quatre échantillons afin de confirmer les résultats du spectrophotomètre. Si l'ADNg est de bonne qualité, une traînée montrant l'efficacité de la réaction enzymatique devrait être visible sur gel. C'est en effet ce que nous observons à la figure 25.

2.3. Recherche de promoteur par GenomeWalker (CLONTECH)

2.3.1. Principe

La méthode GenomeWalker repose sur quatre étapes résumées sous forme d'un schéma en annexe 4. L'étape 1 consiste en une digestion de l'ADN génomique de la plante étudiée par différentes enzymes de restriction. On se retrouve ainsi avec un ensemble de fragments de différentes tailles, parmi lesquels on espère trouver le promoteur recherché. Après purification, des adaptateurs sont fixés aux extrémités 3' et 5' de tous ces fragments (Etape 2). Une première amplification est réalisée avec l'amorce externe s'hybridant à l'adaptateur situé en 5' et une amorce externe spécifique de notre isoforme d'intérêt (Etape 3). Enfin, la quatrième étape consiste en une seconde amplification (nested PCR) grâce à l'amorce interne de l'adaptateur 5' et une amorce spécifique interne à celle déjà utilisée.

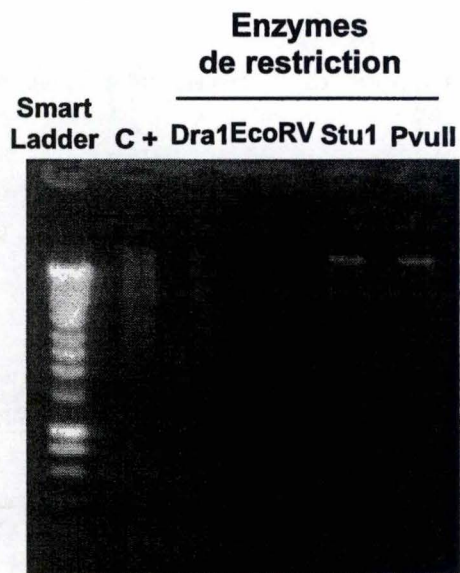


Figure 26: Digestion de l'ADN génomique de *C. intybus* par différentes enzymes de restriction. Le contrôle positif (C+) est la digestion de l'ADNg humain par Pvu II.

Les fragments obtenus n'ont plus qu'à être purifiés et clonés afin de pouvoir être séquencés.

2.3.2. Amorces spécifiques in et out

Des amorces spécifiques in et out ont été commandées à partir des isoformes CiFr02 et CiFr06. Au moins une des deux amorces doit être hautement spécifique de la séquence recherchée afin que seule cette dernière soit amplifiée.

Les amorces doivent également posséder quatre propriétés imposées par le kit GenomeWalker : - Elles doivent être longues de plus ou moins 26 bp.

- Leur contenu en G et en C doit être compris entre 40 et 60 %
- Leur température d'hybridation doit se situer aux alentours de 67°C.
- Il doit y avoir un minimum de trois G et/ou C dans les six dernières positions de l'extrémité 3'

Vu qu'il y a parfois peu de différence entre les isoformes, les endroits où peuvent être pris les amorces sur la séquence sont assez limités. Nos amorces n'ont donc pas toutes les propriétés demandées car certaines concessions ont dû être faites.

Les amorces utilisées sont nommées respectivement GwPrCiFr6ex, GwPrCiFr6in, GwPrCiFr2ex et GwPrCiFr2in (leur caractéristiques est repris sur le tableau 7). L'endroit où elles s'hybrident sur la séquence est montré en annexe 4.

Amorces	bp	(%GC)	Tm
GwPrCiFr2ex	24	50	72°C
GwPrCiFr2in	21	57	66°C
GwPrCiFr6ex	24	50	68°C
GwPrCiFr6in	24	41	72°C

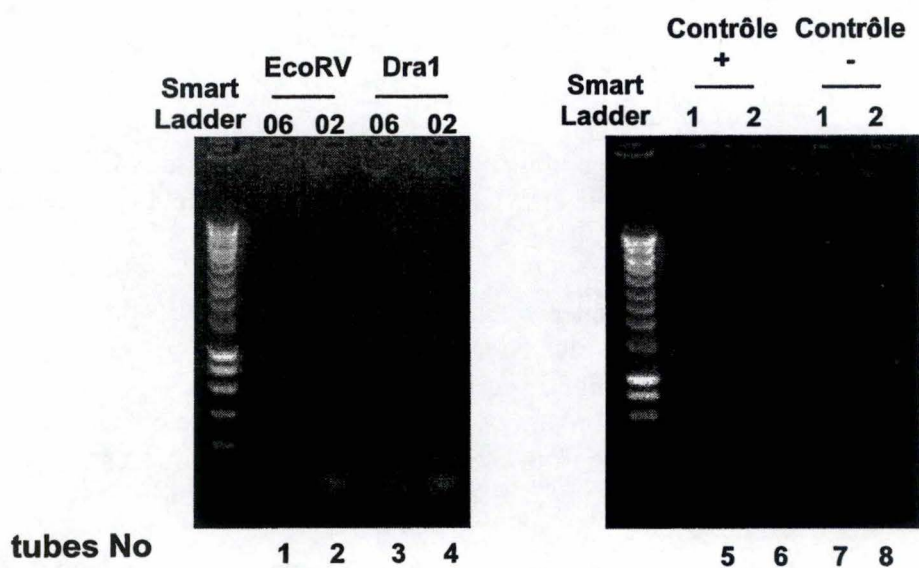
Tableau 7 : caractéristiques des amorces spécifiques GenomeWalker

2.3.3. GenomeWalker

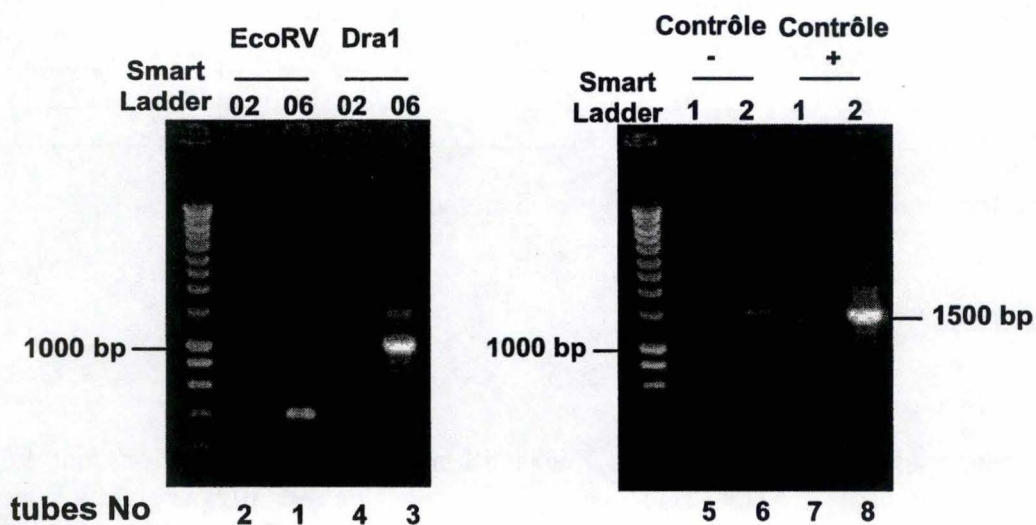
Digestion

L'ADN génomique utilisé est celui de l'échantillon C3. Quatre digestions ont été réalisées sur 20 µl (1 µg) d'ADN (pour un volume total de 40 µl par tube) avec respectivement les enzymes de restriction Dra I, EcoRV, Stu I et Pvu II. En parallèle, l'action de l'enzyme Pvu II sur de l'ADNg humain fourni par le kit nous a servi de contrôle positif.

Si la réaction fonctionne, une traînée doit apparaître après migration sur gel des produits de digestion. La figure 26 montre les résultats obtenus : le contrôle positif a fonctionné, de même que les digestions réalisées avec Dra I et EcoRV. Pour les deux autres enzymes, les ADNg sont restés intacts. Ces derniers ne seront donc pas repris pour la suite de la manipulation.



Figures 27 et 28: Première amplification des fragments de Cifr02 et Cifr06 avec l'amorce GenomeWalker out et l'amorce spécifique out de chacune de ces isoformes.



Figures 29 et 30: Deuxième amplification des fragments Cifr02 et Cifr06 avec l'amorce GenomeWalker in et l'amorce spécifique in de chacune des isoformes.

Purification

La purification se fait à partir de phénol et de chloroforme. Les culots de chaque échantillon (trois au total) sont resuspendus dans 20 µl de TE (10mM/0,1mM) pH 7,5.

Cette étape est limitante car le culot obtenu est peu important et n'adhère pas bien à la paroi. Il était très peu visible chez le contrôle positif, ainsi que chez l'ADNg digéré par EcoRV.

Amplification des fragments d'intérêt

Après l'étape de ligation des adaptateurs, les PCR primaires sont réalisées avec l'amorce out de l'adaptateur et l'amorce spécifique out à chacune des deux séquences. Huit tubes différents sont utilisés.

Tube 1 : amplification du fragment de CiFr06 à partir de l'ADNg digéré par EcoRV en utilisant l'amorce GwPrCiFr6out.

Tube 2 : amplification du fragment de CiFr02 à partir de l'ADNg digéré par EcoRV en utilisant l'amorce GwPrCiFr2out.

Tube 3 : amplification du fragment de CiFr06 à partir de l'ADNg digéré par Dra 1 en utilisant l'amorce GwPrCifr6out.

Tube 4 : amplification du fragment de CiFr02 à partir de l'ADNg digéré par Dra 1 en utilisant l'amorce GwPrCiFr2out.

Tube 5 : contrôle négatif 1. Il est réalisé sans ADNg avec l'amorce contrôle out (humain).

Tube 6 : contrôle négatif 2. Il est réalisé sans ADNg de *C. intybus* avec les amorces spécifiques out.

Tube 7 : contrôle positif 1. Amplification du fragment contrôle à partir de l'ADNg humain digéré par Pvu II en utilisant l'amorce contrôle out.

Tube 8 : contrôle positif 2. Amplification du fragment contrôle à partir d'une banque contrôle pré-construite en utilisant l'amorce contrôle out.

Les amorces contrôles out et in permettent d'amplifier le locus tPA présent dans le génome humain. Le fragment attendu fait 1500 bp.

Programme : Voir matériel et méthode.

Aucune amplification n'est observable après la PCR primaire (voir figures 27 et 28) avec les amorces out. Le carnet explicatif reçu avec le kit indique qu'il n'est pas rare de ne rien observer à cette étape.

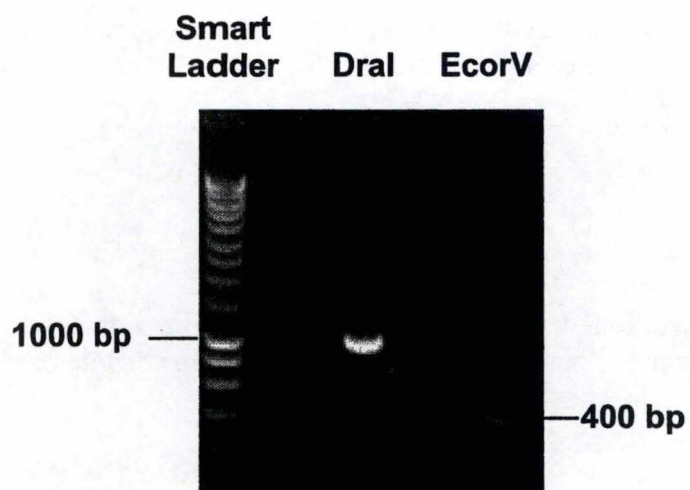


Figure 31: Estimation de la quantité de fragments de 400 et 1000 bp de Cifr06 obtenu par le kit GenomeWalker.

La PCR secondaire a été réalisée avec les amorces in de l'adaptateur, des contrôles et des isoformes spécifiques mais la composition des tubes et le programme PCR restent les mêmes que pour la première PCR. La migration de 5 des 65 µl de chaque produit de la deuxième PCR est montrée en figures 29 et 30.

Résultats :

- Seul le contrôle positif 2 (tube 8) a fonctionné : la bande à 1500 bp est bien présente. Le fait qu'il n'y ait rien pour le contrôle 1 est sans doute dû à une perte d'ADN lors de l'étape critique de la purification.
- On observe la présence d'un contaminant au niveau du contrôle négatif 2 (tube 6), celui réalisé avec les amorces spécifiques à nos isoformes. Un peu d'ADNg de *C.intybus* a pu se déposer malencontreusement sur le tube. Comme deux PCR successives sont réalisées, il a pu y avoir amplification.
- Aucune amplification n'est observée avec les amorces CiFr02 (tubes 2 et 4). Le problème peut se situer au niveau de l'amorce GwPrCiFr2in qui compte seulement 21 paires de bases. Or, le kit recommande des amorces d'au moins 26 bp. Les autres amorces n'ont que deux bp en moins mais il en manque tout de même cinq à l'amorce CiFr02 in, ce qui peut poser des problèmes d'hybridation.
- Un fragment d'environ 1000 bp a été amplifié à partir de l'ADNg clivé par Dra 1 (tube 3). S'il s'agit bien d'un bout de séquence de CiFr06, une partie du promoteur serait alors disponible. En effet, l'amorce in va s'hybrider environ à 530 bp en aval du début de la séquence : il resterait donc 470 bp en amont qui feraient partie du promoteur.
- Un fragment de 400 bp est présent dans l'échantillon PCR correspondant à l'ADNg digéré par EcoRV et utilisant les amorces CiFr06 (tube 1). Il pourrait y avoir un site EcoRV au niveau de la région 5' en amont. Ceci expliquerait la taille obtenue pour cette amplification.

Clonage

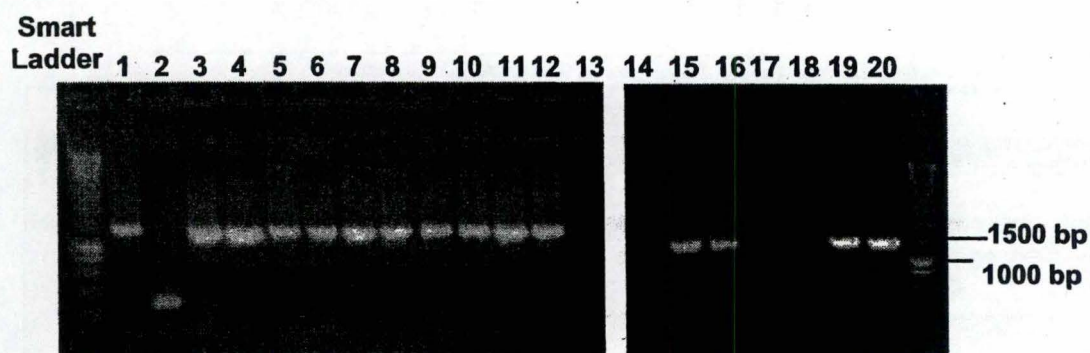
Les deux fragments EcoRV-CiFr06 et Dra1-CiFr06 ont été purifiés à partir de microcon 100. Un µl de chaque produit PCR purifié a été mis sur gel afin d'estimer la quantité d'ADN (Figure 31).

Echantillon Dra1 (Fragment D) : 500 ng/ µl

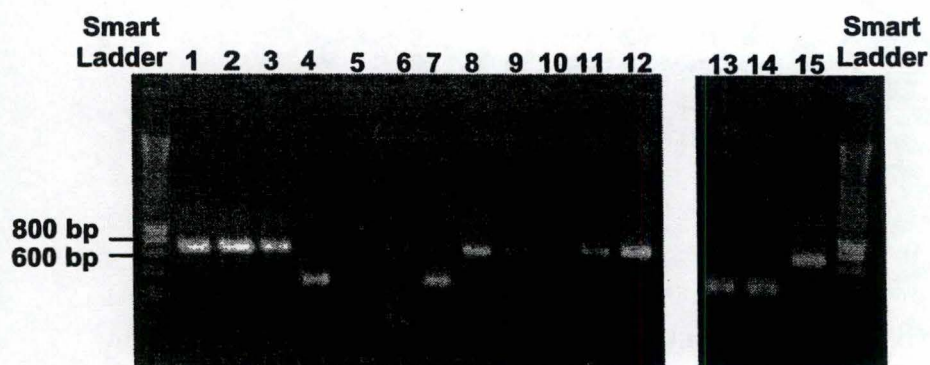
Echantillon EcoRV (Fragment E): 40 ng/ µl

La ligation des deux fragments s'est faite dans PCR II. Les vecteurs ont été utilisés pour transformer les bactéries TOP 10 F'. Les amplicons attendus doivent faire respectivement aux alentours de 700 bp et de 1300 bp (les amorces forward et reverse vont s'hybrider à plusieurs dizaines de paires de bases de part et d'autre du fragment). Les résultats du criblage sur les colonies blanches sont montrés sur les figures 32 et 33 pour les bactéries contenant PCR II avec le fragment D (Dra I) et sur les figures 34 et 35 pour les clones contenant PCR II avec le fragment E (EcoRV). La transformation a bien fonctionné car le nombre de clones positifs est élevé.

Sept clones sont sélectionnés afin de réaliser une PCR préparative pour le séquençage : il s'agit de D12 et D16 (Figures 32 et 33) et E4, E8, E11 (Figure 34 et 35). La lettre

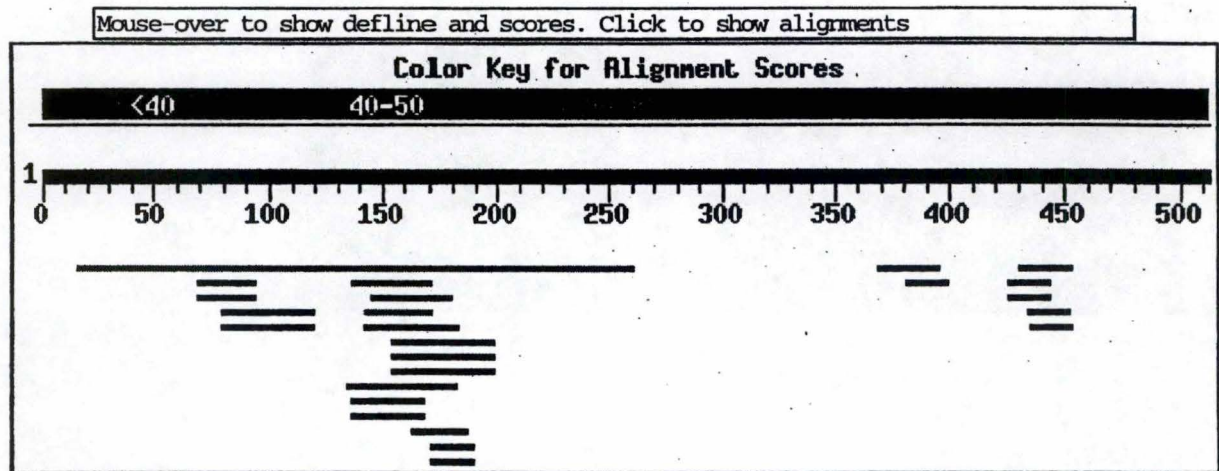


Figures 32 et 33: vérification de la présence de l'insert de 1000 bp de Cifr06 dans le vecteur PCR II des colonies positives résultant de la digestion Dra I de l'ADNg
Les amorces utilisées sont forward et reverse.



Figures 34 et 35: vérification de la présence de l'insert de 400 bp de Cifr06 dans le vecteur PCR II des colonies positives résultant de la digestion Eco RV de l'ADNg
Les amorces utilisées sont forward et reverse.

Distribution of 25 Blast Hits on the Query Sequence



Sequences producing significant alignments:

Sequences producing significant alignments:					Score (bits)	E Value
gi	4127659	emb Y11124.1 CIPINVERT	C.intybus mRNA for putati...	184	4e-44	
gi	1764030	emb Z83747.1 PSZ83747	Pisum sativum var. final	62	4e-07	
gi	12744924	gb AF332881.1 AF332881	Citrus unshiu cell wall ...	54	9e-05	
gi	861154	emb Z35162.1 VFCWINV1	V.faba VFCWINV1 mRNA for ce...	50	0.001	

Figure 36 : Recherche blast du fragment D12 séquencé en forward

représente le nom de l'enzyme de restriction avec laquelle les fragments ont été générés et le chiffre représente le numéro du clone.

2.3.4. Résultats de la recherche de promoteurs par GenomeWalker

Une recherche sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/index.html> montre que notre séquence D12 présente un haut pourcentage d'identité avec l'invertase de *C. intybus* Y11174 obtenu à l'origine par le laboratoire (Figure 36). La séquence amplifiée est donc bien une isoforme d'invertase. La comparaison de la séquence de D12 avec celle de CiFr06 vient d'ailleurs confirmer qu'il s'agit bien de la même isoforme.

La séquence de l'amorce spécifique GwCiFr6in termine bien le fragment amplifié. En remontant de 359 nucléotides, nous retrouvons les cinq bases correspondant à la fin de l'amorce ingotch, mais les suivantes ne correspondent plus : sous réserve de résultats supplémentaires, la séquence serait interrompue par un intron.

Un alignement des séquences D12, D16 et E11 montre que ces séquences sont les mêmes (voir annexe). Il existerait bien un site EcoRV au niveau du promoteur pour justifier la plus petite taille des fragments amplifiés à partir de l'ADNg digéré par cette enzyme de restriction. Le manque de temps et les problèmes rencontrés par l'Unité interfacultaire de séquençage ne nous a pourtant pas permis d'approfondir la question.

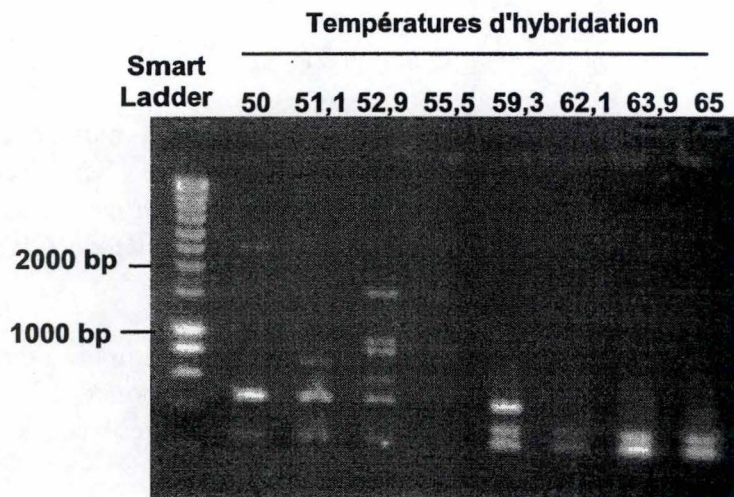


Figure 37: Essai d'amplification du promoteur de Cifr02 à différentes températures d'hybridation à l'aide de l'amorce Cifr02out utilisée pour GenomeWalker.

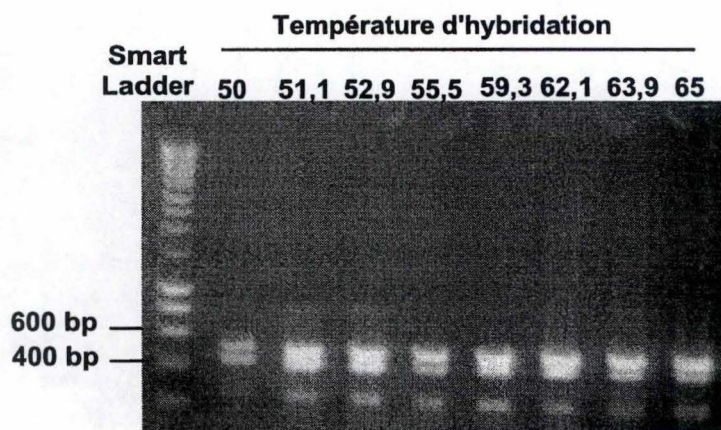


Figure 38: Essai d'amplification du promoteur de Cifr02 à différentes températures d'hybridation à l'aide de l'amorce Cifr02 in utilisée pour GenomeWalker

2.4. Recherche de promoteurs par AP-PCR (arbitrarily primed PCR)

La méthode GenomeWalker n'ayant pu nous permettre d'obtenir la séquence du promoteur de CiFr02 (voir figure 29 et 30), nous avons réalisé un nouvel essai sur cette isoforme en utilisant la méthode de AP-PCR, une modification de la RAP-PCR (Menke and Mueller-Roeber, 2001) qui offre l'avantage d'amplifier notre fragment d'intérêt en réalisant une seule PCR et ceci sans avoir recourt aux étapes de restriction et de ligation d'adaptateurs.

2.4.1. Principe

La RAP-PCR (RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction) permet, en théorie, d'amplifier des ARNm présents en petite quantité avec un haut degré de reproductibilité et de sensibilité. Elle est généralement utilisée pour l'étude différentielle de banques de transcrits.

La première étape de la RAP-PCR consiste en une RT à 37°C grâce à une amorce choisie dans ce cas particulier pour être spécifique de l'isoforme choisie. Par après, une seconde synthèse sur le premier ADNc est réalisée avec la même amorce à une température d'hybridation comprise entre 36 et 42°C. On obtient ainsi avec une collection d'ADNc avec une séquence correspondante à l'amorce aussi bien à l'extrémité 5', qu'à l'extrémité 3'. Ensuite, ces fragments servent de matrices pour une amplification PCR ordinaire à température d'hybridation plus élevée et donc, plus spécifique.

2.4.2. Adaptation de la méthode à notre recherche

Partant de ce principe de RAP-PCR nous avons mis au point un programme AP-PCR permettant d'isoler le promoteur de CiFr02 à partir d'ADNg de *C. intybus* en utilisant séparément les amorces CiFr02 in et CiFr02 ex, déjà utilisées pour GenomeWalker. La première différence avec la technique de départ provient donc du matériel utilisé : nous travaillons sur de l'ADN génomique et non sur de l'ARNm.

Voici le programme utilisé :

Température	Temps	Nombre de cycle
94°C	10 min.	
50 à 65°C	1 min.	1
72°C	20 min.	
37°C	5 min.	1
94°C	1 min.	40
50 à 65°C	1 min.	
72°C	1 min.	
72°C	10 min.	1
10°C	infini	1

Tableau 8 : programme AP-PCR.

Un premier cycle à une température d'hybridation élevée est réalisée : notre amorce spécifique de CiFr02 va s'hybrider sur l'ADNg. Ensuite, la température est abaissée à 37°C : on espère ainsi que l'amorce va aller s'hybrider non spécifiquement quelque part, le plus loin possible en amont de la séquence de CiFr02 afin que son promoteur soit amplifié. Ensuite, la

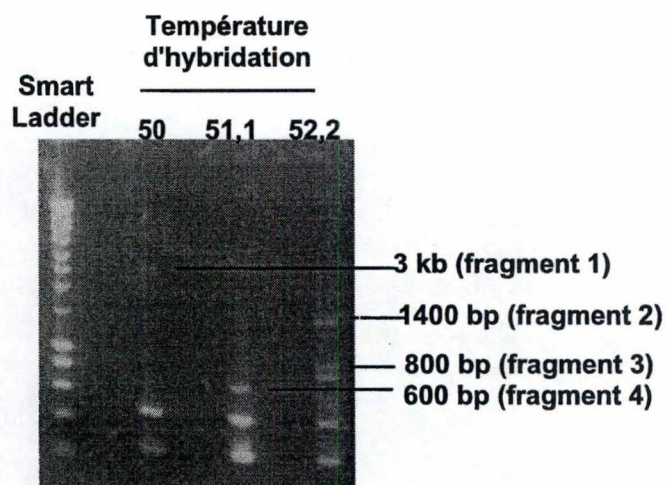


Figure 39: Récupération des fragments d'intérêt obtenus à partir de l'amorce Cifr02 out pour la recherche du promoteur de Cifr02.

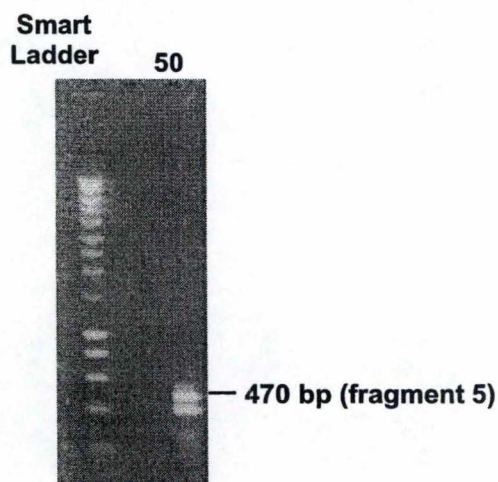


Figure 40: Récupération du fragment d'intérêt obtenus à partir de l'amorce Cifr02 in pour la recherche du promoteur de Cifr02.

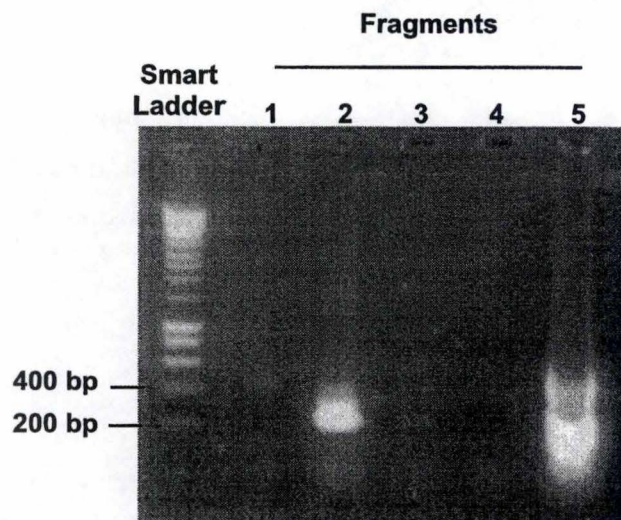


Figure 41: Amplification des fragments 1, 2, 3 et 4 avec les amorces Cifr02 out et Inv. gotch d'une part et amplification du Fragment 5 avec les amorces Cifr02 in et Inv drwa d'autre part.

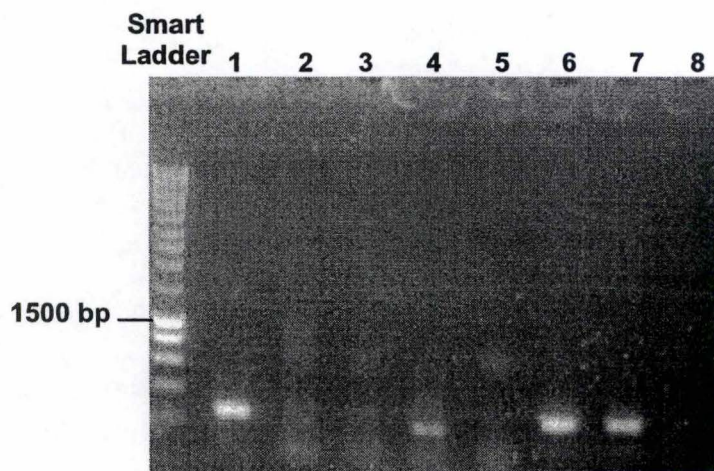


Figure 42: Vérification de la présence du fragment 2 dans le vecteur PCR II des colonies positives. Les amorces utilisées sont forward et reverse.

PCR reprend un schéma classique en augmentant de nouveau la température d'hybridation à une valeur plus spécifique.

Dans le programme, on remarque que les températures d'hybridation sont comprises entre 50 et 65°C car l'appareil PCR utilisé peut créer établir un gradient de température. Par conséquent, plusieurs température d'hybridation peuvent être testées en même temps. Huit températures ont été testées (en °C) :

A : 65	E : 55,5
B : 63,9	F : 52,9
C : 62,1	G : 51,1
D : 59,3	H : 50,0

Les lettres correspondent à l'emplacement des tubes tel que défini sur une plaque multipuits (96).

2.4.3. Résultats

Les amorces CiFr02in et CiFr02out ayant des séquences, des longueurs et des propriétés différentes, les résultats attendus doivent être différents. Les amplicons obtenus avec CiFr02 in (résultats en figure 37) sont de même taille quelle que soit la température d'hybridation employée. Par contre, la taille des fragments varie avec la T_m en utilisant l'amorce ex de Cifr02 (figure 38). Quelques bandes à ce niveau peuvent être intéressantes car elles sont d'assez longues tailles si elles correspondent bien au promoteur de CiFr02.

Le reste des échantillons correspondant au trois première pistes de la figure 37 et à la première piste de la figure 38 est mis à migrer afin de pouvoir découper les bandes d'intérêts. Cinq fragments sont récupérés : ils sont montrés en figure 39 et 40.

Après purification des fragments, un test a été réalisé afin de vérifier s'ils correspondent bien à un morceau de CiFr02. Ce test consiste en une amplification d'une partie de ces fragments avec l'amorce GwCiFr02 in et de l'amorce Invgotch. S'il s'agissait bien de CiFr02, nous aurions du obtenir des amplicons de 385 bp.

Les résultats (Figure 41) montrent qu'aucune bande nette à 385 bp n'est obtenue pour aucun des fragments. Une tentative de clonage a cependant été réalisée sur le fragment No2 car c'est le seul à présenter une « tache » d'amplification entre 200 et 400 bp.

Le clonage a été effectué dans des bactéries TOP 10 F' avec PCR II en suivant le même protocole que précédemment. Peu de colonies blanches ont malheureusement été obtenues et seulement 8 ont pu être repiquées. Un criblage afin de vérifier la présence de l'insert de 1400 bp a été réalisé sur ces huit clones. Les fragments attendus devaient se trouver aux alentours de 1660 bp (1400 bp du fragment No2 + 260 bp du vecteur). Cependant, la figure 42 montre qu'aucun amplicon de cette taille n'est présent. Le manque de temps ne nous a pas permis de pousser plus loin nos analyses.

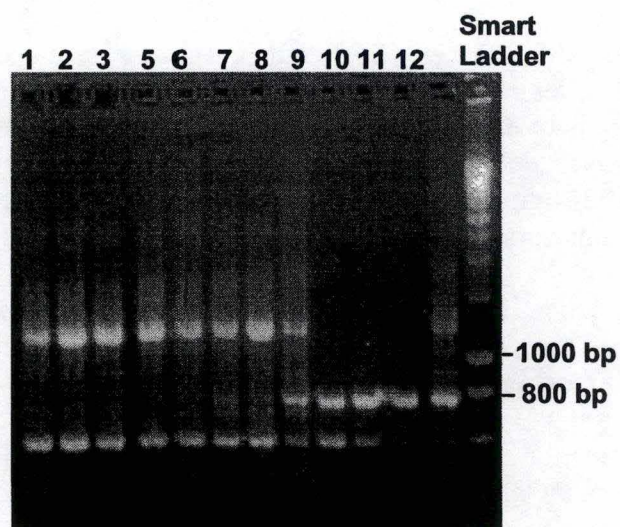


Figure 43 : Amplification avec les amorces Invgotch et Invdrwa des fragments d'invertases de 770 bp des prélèvements sur les ADNc des différents prélèvements.

3. Etude des modification du taux de transcrit d'invertases chez *C. intybus* en cours de saison

3.1. Choix de la technique

Les résultats préliminaires concernant les distributions relatives des isoformes dans la racine de chicorée avant et après l'exposition au froid semblent démontrer une variation du niveau d'expression transcriptionnelle de certaines séquences. Ainsi, conformément aux résultats présentés à la figure 22, on constate que CiFr06 pourrait surexprimée avant le coup de froid alors que la transcription de CiFr02 et CiFr05 serait favorisée suite au passage sous la barre des 0°C.

Une étude semi-quantitative préliminaire réalisée au laboratoire sur l'ensemble des 14 prélèvements à l'aide d'amorces dégénérées s'hybridant à des régions conservées a permis d'observer une augmentation nette du niveau de transcrits après l'exposition au froid (Figure 43). Bien que ces résultats présentent un intérêt certain, ils ne nous permettent pas de déterminer avec certitude s'il s'agit d'une augmentation globale de l'ensemble des transcrits ou si, comme nous le pensons, seuls CiFr02 et CiFr05 sont surexprimées.

Nous avons donc cherché à utiliser une technique sensible et hautement spécifique : nous nous sommes donc tournés vers la RT-PCR semi-quantitative.

3.2. La RT-PCR semi-quantitative

Cette technique consiste en une RT sur les ARNm dont on veut connaître le taux d'expression. Une amplification des fragments d'intérêts est ensuite réalisée sur les ADNc obtenus. Les produits d'amplification sont alors mis à migrer sur gel d'agarose afin de pouvoir quantifier les bandes d'amplicons.

La RT-PCR semi-quantitative offre l'avantage d'être un test hautement sensible qui permet de détecter un taux de transcrits parfois très bas. De plus, elle permet de travailler avec un grand nombre de prélèvements et de gènes différents durant la même expérience (Willard *et al.*, 1999).

Quelques points importants sont cependant à prendre en considération. Il faut premièrement choisir un standard adéquat qui doit être un fragment d'un gène constitutif : la mesure du taux d'expression est le rapport de l'intensité de la bandes des amplicons par rapport à celle du standard. Deuxièmement, les amorces choisies doivent répondre à certains critères. Elles doivent être hautement spécifiques des séquences à amplifier. Il a fallu d'ailleurs vérifier, après avoir défini nos amorces pour nos isoformes choisies, que celles-ci n'amplifiaient pas les autres isoformes. Ensuite, ces amorces doivent amplifier des fragments entre 150 et 350 bp. Enfin, elles doivent avoir des T_m proches afin que nos séquences d'intérêt et notre standard puissent être amplifiés dans les mêmes conditions.

Cichorium intybus beta-tubulin mRNA, partial cds

>AF101419

CCCGAATCTCGGTTTCTCTCTTTACCAACCAGTAAAGATGCGTGAGATCCTTCATA
TTCAAGGTGGTCAATGTGGAAACCAGATCGGAGCTAAGTTCTGGGAGGTTGTCTG
CGCCGAGCACGGCATTGATGTGACCGGAAAGTACACCGGAGACTCCGAGCTCCA
GCTTGAGAGGATCAATGTCTATTACAACGAGGCCAGTGGCGGGAGGTTTGTTCG
CGTGCGGTGCTTATGGATCTGGAGCCAGGGACGATGGACAGTCTCAGATCTGGTG
CCTACGGACAGATCTTCAGGCCTGATAACTTTGTCTTTGGTCAGTCTGGTGCCGGT
AACAATTGGGCGAAGGGACATTATACTGAAGGTGCTGAGTTGATCGACTCGGTTT
TGGATGTTGTTAGGAAGGAGGCCGAAAATTGTGATTGCTTACAAGGTTTCCAGGT
ATGCCATTCTCTAGGAGGTGGTACAGGATCTGGTATGGGAACACTTCTGATCTCN
AAGATCAGGGAAGAATATCCAGACAGGATGATGATGACCTTCTCTGTCTTTCCAT
CTCCA

Figure 44a : site de l'hybridation des amorces CiNDtub3' et CiNDtub5'

>CiUbi1

AAAGCCATCACCTTGGAAGTTGAgAGTTCCGaCACCATCGATAAcGTCAAAGCCAA
GATCCAAGaCAAGGAAGGAaTCCCCCAGaCCAGCAGAGATTGATcTTCGCCGGGa
AACAGCTcGAGGaCGGCCGTACCcTAGCCGATTACAACATCCAGAAGGAGTCCAC
CCTCCATTTGGTCCTCCGTCTCcgGGGTGGTATGCAGAtTTTCGTGAAGACGTTGtCC
GGCAAGACCATCACCTTGGAAGTGGAAAGCTCCGACACCATCGACAACGTGAAG
GCCAAGATCCAAGATAAGGAAGGAATCCCTCCAGACCAGCAGAGGTTGATCTTC
GCCGTAAGCAGCTAGAGGACGGCCGTACCCTCGCCGATTACAACATCCAAAAG
GAATCCACCCTCCATTTGGTCCTCCGTCTCCGTGGTGGTATGCAGATCTTCGTGAA
GACGTTGACCGGTAAGACCATCACCTTGGAAGGTTGAAAGCTCCGACACCATGAC
AACGTTAAGGCCAAAATCCAGGACAAGGAAGGGATTCCCCCAGACCAGCAGCGA
TTGATCTTCGCCGGCAAGCAGCTTGAAGATGGTCGAA

Figure 44b : site de l'hybridation des amorces CiUbiRt3 et CiUbiRt5

3.3. Choix d'un standard

La tubuline, une molécule présente constitutivement chez tous les êtres vivants, est un des standards internes utilisés pour mettre en évidence une différence d'expression transcriptionnelle d'un gène donné dans une condition particulière (Malcolm Campbell, 2001).

D'autre part, d'autres gènes constitutifs peuvent servir de référence, c'est le cas de l'ubiquitine ou de l'actines (Dardis *et al.*, 1999)

Quatre amorces ont été définies afin d'amplifier un fragment de la tubuline d'une part et de l'ubiquitine d'autre part.

CiNDTub 3' (Amorce tubuline 3') :

5'-GAT-CAA-CTC-AGC-ACC-TTC-AG-3'

CiNDTub 5' (Amorce tubuline 5') :

5'-ACC-AGA-TCG-GAG-CTA-AGT-TC-3'

L'endroit sur la séquence de la tubuline où ces deux amorces vont s'hybrider est mis en évidence en figure 44a. Le fragment généré est de 298 paires de base.

CiUbiRt3 (Amorce ubiquitine 3') :

5'-CAA-CGT-CTT-CAC-GAA-GAT-C-3'

CiUbiRt5 (Amorce ubiquitine 5') :

5'-CGA-TTA-CAA-CAT-CCA-GAA-GG-3'

L'endroit sur la séquence de l'ubiquitine où ces deux amorces vont s'hybrider est mis en figure 44b. Le fragment généré est de 314 paires de bases.

Ces quatre amorces font une vingtaine de paire de bases et ont une température d'hybridation entre 55 et 60°C.

Une PCR est réalisée avec les amorces tubuline dans un premier tube et les amorces ubiquitine dans un deuxième en utilisant l'ADNc provenant de l'échantillon 7. Cette manipulation préliminaire a pour but de tester les deux couples d'amorces. Seules les amorces fournissant un seul amplicon à la taille attendue seront retenues.

Le programme utilisé, défini comme le programme PCR sqInv, est le suivant :

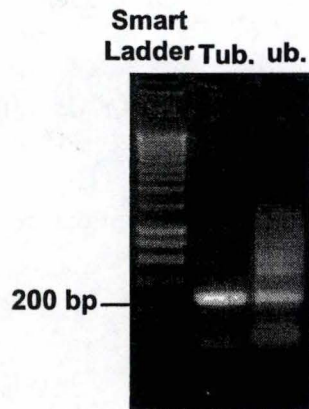


Figure 45: Test des amorces tubuline et ubiquitine sur ADNc de *C. intybus*

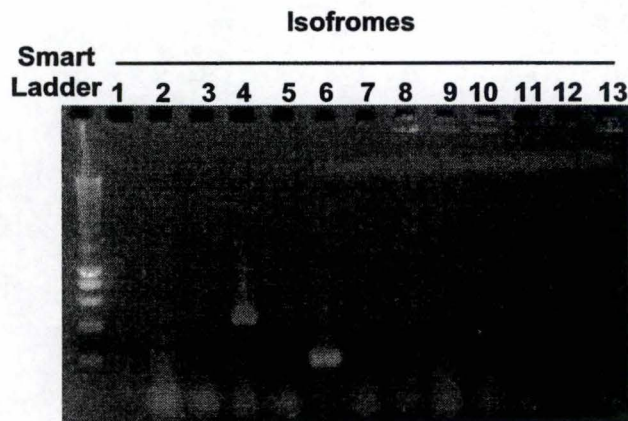


Figure 46: Amplification sur colonies des différentes isoformes d'invertases par les amorces PCRsq 3' et 5' de Cifr06.

Température (en °C)	Temps (en minutes)	Nombre de cycles
94	10	1
94	1	40
55	1	
72	1	
94	7	1

Tableau 9 : programme PCR sqInv

Les résultats obtenus (fig 45) montrent une amplification non spécifique avec les amorces d'ubiquitine à une température d'hybridation de 55°C. Par contre, seul l'amplicon attendu de 298 paires de bases est présent en utilisant les amorces tubulines. C'est donc cette paire d'amorces qui sera utilisée pour la suite des manipulations.

3.4. Test des amorces CiFr02, CiFr06 et CiFr05

Des amorces pour l'amplification des fragments de CiFr02, CiFr06 et CiFr05 ont été commandées (Tableau 10). Elles ont ensuite été testées afin de vérifier si l'on obtenait bien la taille attendue pour les amplicons, mais aussi si elles n'amplifiaient pas les autres isoformes.

Nom des amorces	bp	Tm	Taille du fragments généré
CiFr06Rt3	20	58°C	258 bp
CiFr06Rt5	20	62°C	
CiFr05Rt3	22	62°C	237 bp
CiFr05Rt5	20	68°C	
CiFr02Rt3	20	56°C	222 bp
CiFr02Rt5	23	58°C	

Tableau 10 : caractéristiques des amorces de CiFr06, CiFr05 et CiFr02

Ces amorces font toutes une vingtaine de paires de bases et ont une température d'hybridation aux alentours de 60°C. Cela nous a permis d'amplifier nos fragments (ceux d'intérêt et celui du standard) en même temps et dans les mêmes conditions tout au long de l'expérimentation.

Pour tester nos amorces, une amplification des fragments d'intérêt a été réalisée sur des clones contenant l'insert correspondant à l'isoforme choisie, mais également sur des clones contenant l'insert de chacune des autres isoformes. Le but de cette manipulation est de vérifier si nos amorces n'amplifient que l'isoforme d'intérêt. Le programme utilisé est PCR sqInv, le même ayant servi à l'amplification de la tubuline.

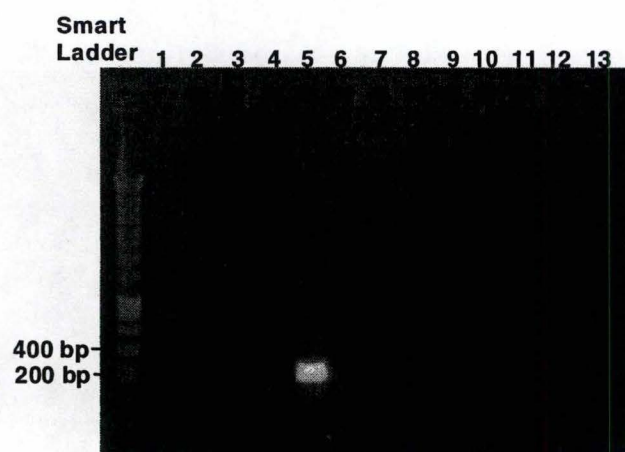
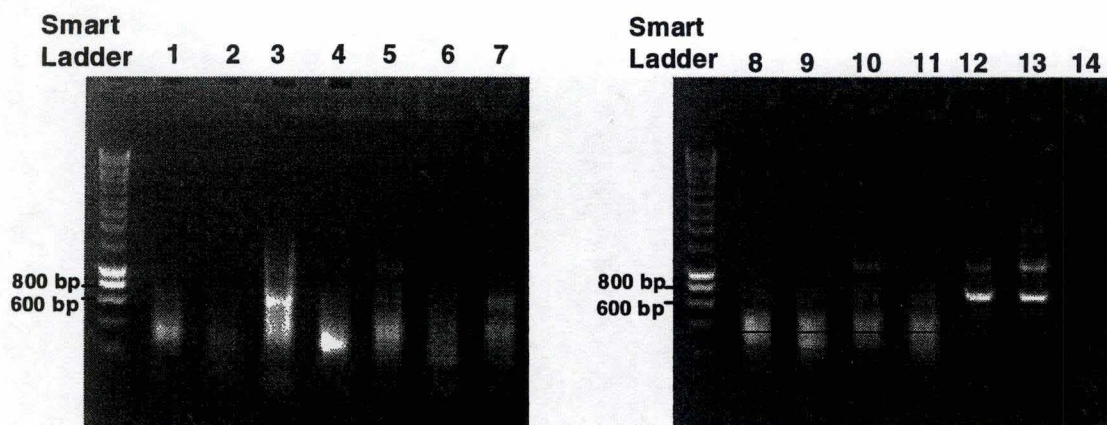
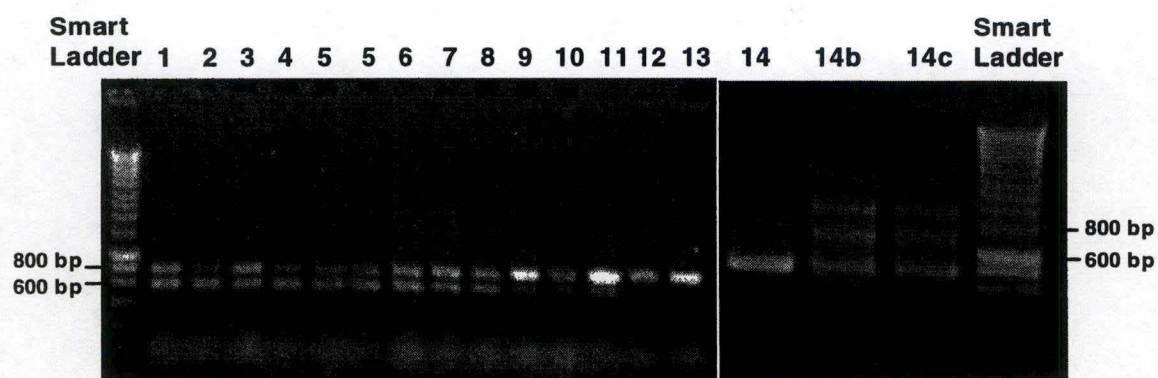


Figure 47: Amplification avec les amorces CiFr5Rt3 et CiFr5Rt5 du fragment de CiFr05 sur treize colonies contenant les différents inserts d'invertases.



Figures 48 et 49: Amplification des fragments d'invertases avec les amorces invgotch et invdrwa sur les ADNc des 14 prélèvements.



Figures 50 et 51: Amplification des fragments d'invertases avec les amorces invgotch et indrwa sur de nouveaux ADNc des 14 prélèvements.

Résultats :

L'essai d'amplification sur CiFr02 n'a rien donné : aucun amplicon n'était observable sur gel (résultats non montrés). Le manque de temps ne nous a pas permis de poursuivre l'étude de cette isoforme.

La figure 46 montre les essais d'amplification avec les amorces CiFr6Rt5 et CiFr6Rt3. Le fragment attendu de 237 bp n'est présent que sur la piste 6, correspondant aux colonies contenant l'insert de CiFr06. Les autres inserts n'ont pas été amplifiés à la taille attendue : les amorces sont bien spécifiques à notre isoforme.

Les résultats du même test mais réalisé avec CiFr5Rt5 et CiFr5Rt3 est montré en figure 47: l'amplicon de 222 bp n'est présent qu'au niveau du clone contenant l'insert de CiFr05.

Nous pouvons donc passer sans problème à l'étape suivante car non seulement nos amorces sont spécifiques, mais notre programme nous permet d'amplifier en même temps les fragments de notre standard et de nos deux isoformes.

3.5. La reverse transcription ou RT

Une RT a d'abord été faite sur les quatorze échantillons d'ARN messager prélevés sur la racine de chicorée en cours de saison.

Pour tester la qualité de l'ADNc, une PCR a été réalisée sur ceux-ci avec les amorces invertases dégénérées Invgotch et Invdrwa. Les figures 48 et 49 nous montrent que la plupart de nos ADNc ne semblent pas être de qualité : une traînée est obtenue en place des fragments attendus. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que ces ADNc ont été très souvent utilisés afin de faire différents test. Le fait d'être très souvent décongelés et recongelés a peut être entraîné une dégradation de l'ADNc. Ces ADNc ont donc été écartés.

Une nouvelle RT a été réalisées sur les 14 prélèvements. Les figures 50 et 51 montrent les nouveaux profils d'amplification obtenus avec les amorces Invgotch et Invdrwa. Curieusement, une comparaison avec l'amplification sur d'anciens ADNc (Pistes 14b et 14c) montre une plus grande spécificité d'amplification sur les ADNc récemment synthétisés alors que les PCR ont a chaque fois été réalisées dans les même conditions : on ne remarque plus d'amplification des longs fragments de SST (984 bp).

Malgré cette différence, le résultat obtenu nous confirme la bonne qualité des quatorze échantillons d'ADNc nouvellement synthétisés.

3.6. Recherche de la phase plateau

Afin de détecter une éventuelle différence d'expression de nos isoformes au niveau des racines de chicorée au cours de la saison, il est impératif de définir expérimentalement un nombre de cycles d'amplification juste suffisant pour que la PCR soit toujours dans sa phase exponentielle.

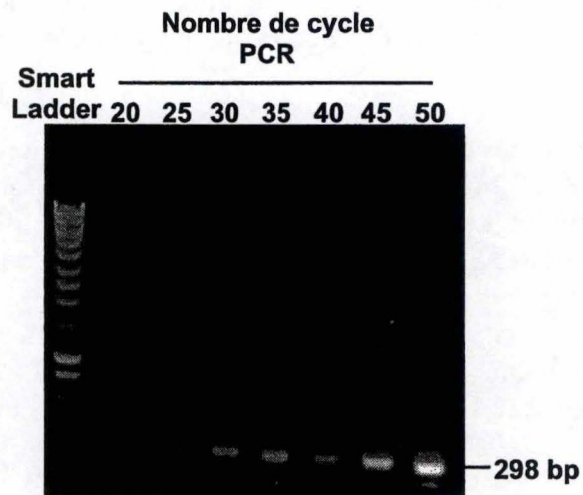


Figure 52: amplification de la tubuline à partir de l'ADNc de l'échantillon 6. Prélèvement tout les cinq cycles.

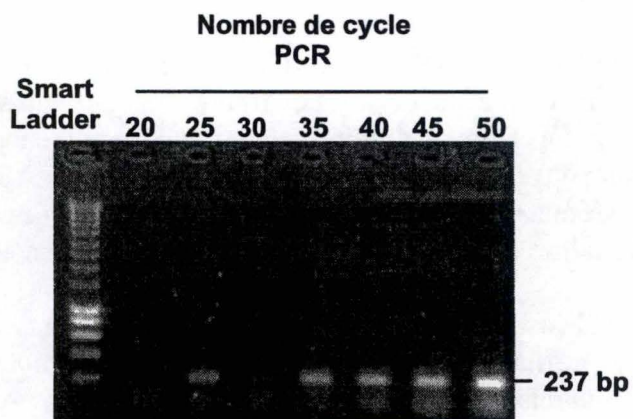


Figure 53: Amplification de Cifr06 à partir de l'ADNc de l'échantillon 12. Prélèvement tout les cinq cycles.

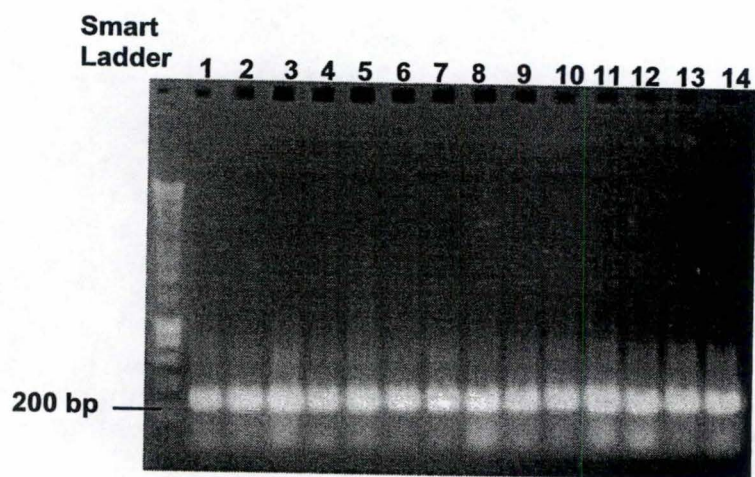


Figure 54: Amplification de la tubuline à partir des 14 échantillons d'ADNc. 45 cycles PCR réalisés.

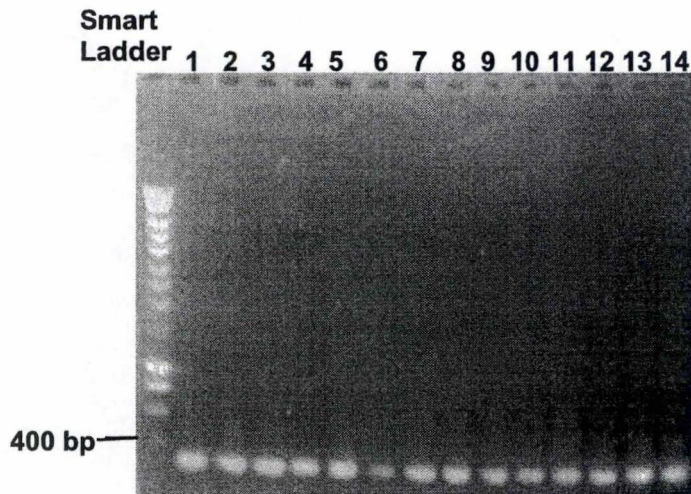


Figure 55: Amplification de la tubuline à partir des 14 échantillons d'ADNc. 35 cycles PCR réalisés.

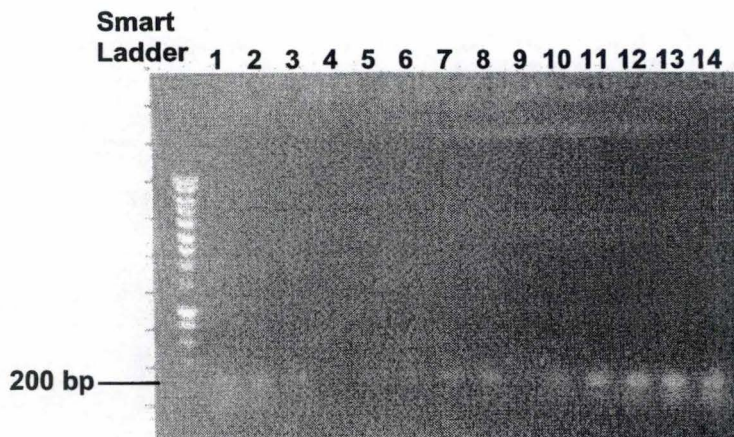


Figure 56: Amplification de CiFr06 à partir des 14 échantillons d'ADNc. 35 cycles réalisés.

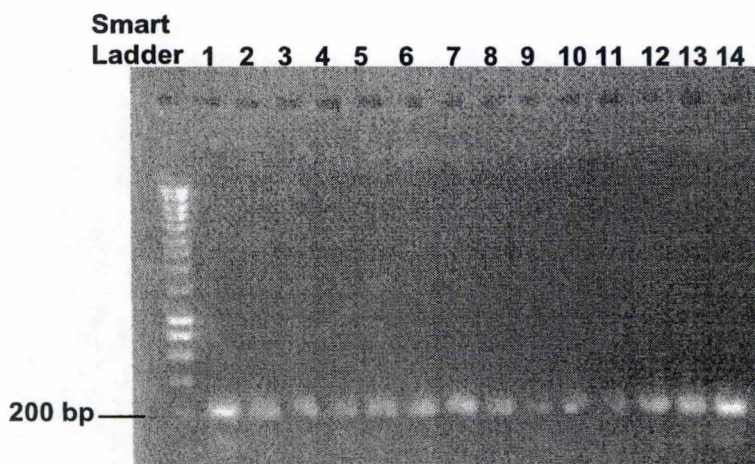


Figure 57: Amplification de CiFr05 à partir des 14 échantillons d'ADNc. 35 cycles réalisés.

En effet, au bout d'un certain nombre de cycles, la quantité d'amplicons n'augmente plus pour différentes raisons (déficience en nucléotides et en amorces, inactivation progressive de la polymérase). Dans ces conditions, la PCR entre en phase plateau. Si cette dernière est atteinte lors de l'amplification de notre isoforme, il n'y aura plus moyen de détecter de différences de niveaux de transcription entre échantillons.

Pour déterminer le début de cette phase plateau, une PCR avec le programme PCR sqInv augmenté de 15 cycles (pour arriver à 50 cycles) est réalisé sur l'ADNc du sixième prélèvement avec d'une part les amorces tubuline (standard) et d'autre part les amorces CiFr06Rt3 et CiFr06Rt5. A partir du vingtième cycle, 5 µl de chaque tube PCR est prélevé.

Les profils obtenus aux figures 52 et 53 montrent que l'amplification ne devient détectable qu'au 25^{ème} cycle, tandis qu'on se trouve toujours en phase exponentielle au 45^{ème}.

3.7. La PCR semi-quantitative

La PCR semi-quantitative est réalisée sur les 14 échantillons d'ADNc avec premièrement les amorces tubuline, notre standard ; ensuite, une autre série de 14 tubes serviront à l'amplification du fragment de 237 bp de CiFr06. Enfin, 14 derniers tubes seront utilisés avec les amorces CiFr05.

Le programme utilisé est toujours PCR sqInv avec un choix de 45 cycles de polymérisation. La figure 54 montre les résultats obtenus pour la tubuline. On observe que les bandes sont trop intenses pour pouvoir être quantifiées. La différence d'intensité entre ces bandes et celles obtenues lors de la recherche de la phase plateau (voir figures 52 et 53) est probablement due au fait que les ADNc utilisés sont différents. Ceux utilisés dans la recherche de la phase plateau provenaient de la première RT. Or ceux-ci n'étaient pas de bonne qualité comme en témoigne les figures 48 et 49. Nous avons donc recommencé la PCR en limitant le nombre de cycle à 35.

3.8. Résultats

L'amplification de la tubuline à partir des 14 échantillons d'ADNc a bien fonctionné :

La figure 55 montre que les bandes à 298 bp se situent toutes dans les mêmes valeurs d'intensité. L'expression de notre standard varie donc très peu.

En figure 56, les bandes correspondant aux fragments de 237 bp de CiFr06 présentent une plus grande variation : leurs intensités sont faibles entre les échantillons trois et dix, plus fortes chez les premiers et derniers échantillons. Le niveau d'expression de l'isoforme CiFr05, en figure 57, semble moins variable au cours de la saison de croissance.

Afin de préciser ces résultats, une quantification des trois gels a été réalisée à partir du programme Quantity One (pour le fonctionnement du programme : voir matériel et méthode). La concentration de chaque bande est calculée par rapport aux bandes du standard Smart Ladder. Par après, la quantification d'une isoforme dans un prélèvement donné est divisée par la quantification de la tubuline dans ce même prélèvement. Quatorze valeurs représentant les 14 échantillons sont ainsi obtenues pour chacune de nos invertases. Les résultats sont présentés sous forme de graphique en figure 58 et 59.

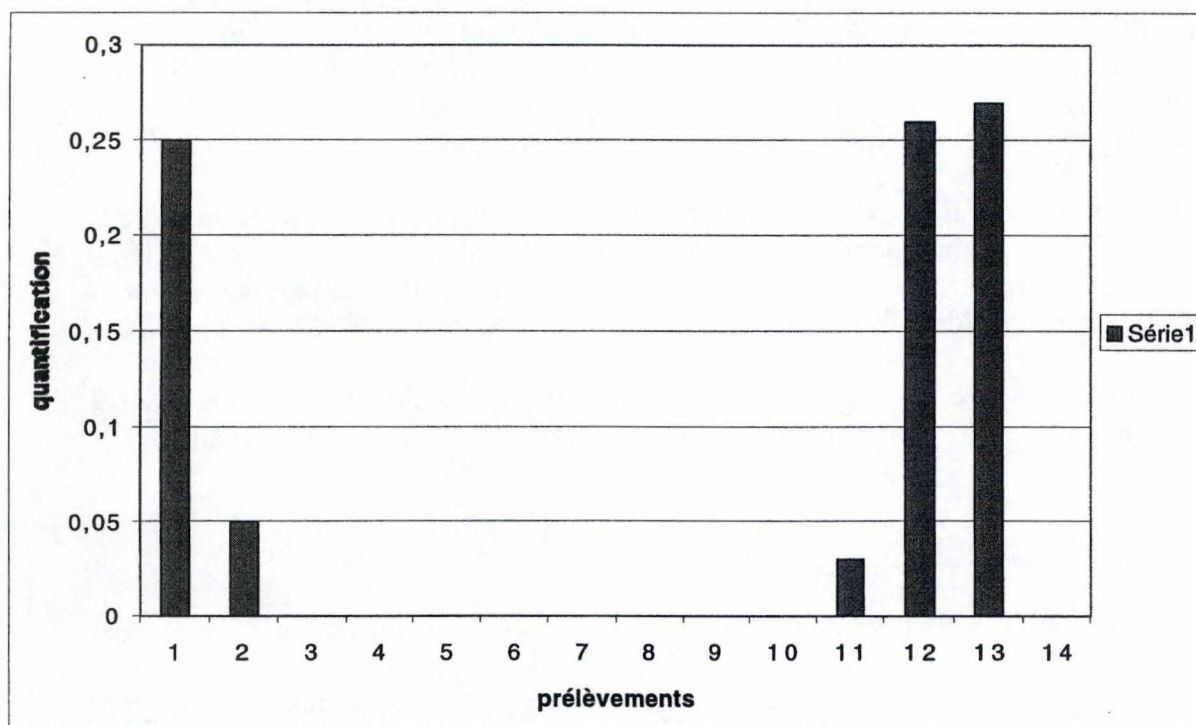


Figure 58 : quantification de l'expression relative de CiFr06 mesurée par RT-PCR sur les échantillons prélevés durant la saison de croissance 1999.

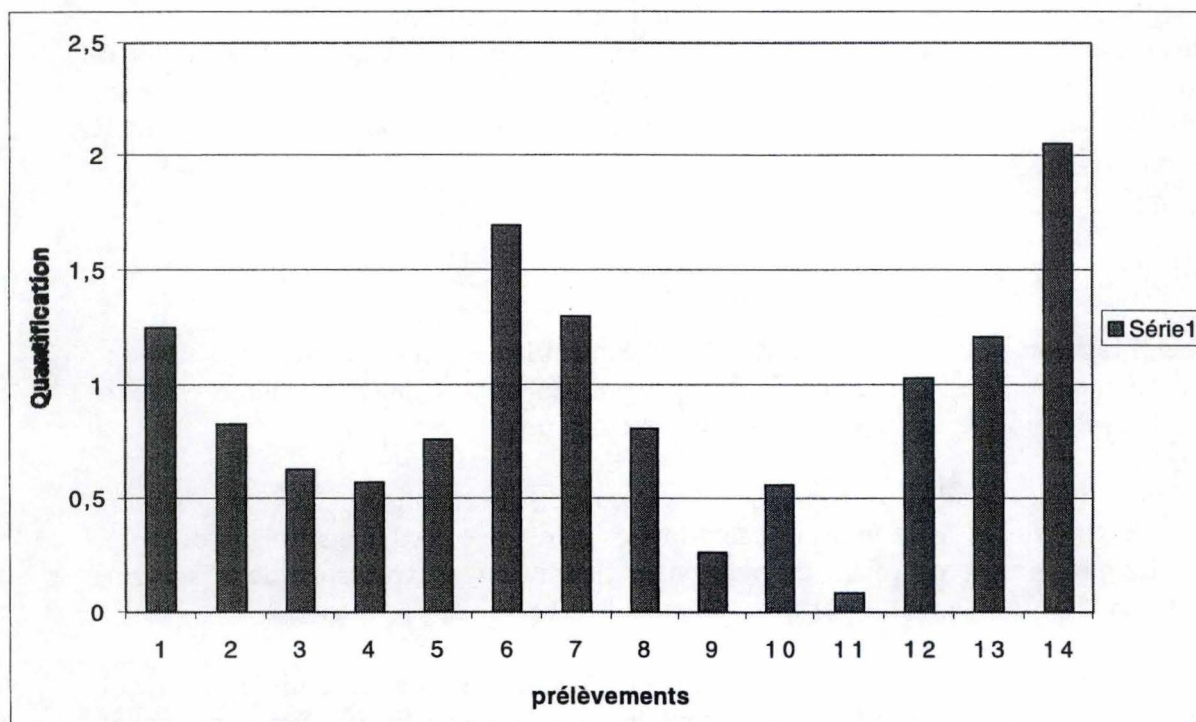


Figure 59 : quantification de l'expression relative de CiFr05 mesurée par RT-PCR sur les échantillons prélevés durant la saison de croissance 1999.

3.9. Concordance des observation sur gel et de la quantification

Le graphique obtenu pour CiFr06 confirme ce qui a été dit précédemment : l'isoforme est surtout présente dans les premiers et derniers échantillons. Seule la lecture obtenue pour le prélèvement 14 semble illogique : La quantification a une valeur nulle alors qu'une bande intense est clairement observée sur gel. Les mesures des échantillons 3 à 10 ont également une valeur nulle car elles sont trop basses pour être calculées par ce programme.

En examinant la figure 59, on s'aperçoit que l'expression de CiFr05 varie beaucoup plus que ce que laissait entrevoir le profil obtenu sur gel. Le taux baisse fortement après l'échantillon 8 (avant le coup de froid) pour augmenter de nouveau à partir du 12 pendant une période froide qui a suivi deux coups de gel. Pour rappel, le premier coup de froid se situe aux alentours de l'échantillon 9 (16 novembre).

Au vu de ces résultats, CiFr06 serait moins exprimée en début d'automne pour être, par la suite, fortement transcrite quelques semaines après la baisse de température. La transcription de CiFr05 ne serait, quant à elle, pas vraiment corrélée aux variations externes de température.

4. Discussion générale

La recherche d'isoformes d'invertases vacuolaires acides par clonage d'amplicons obtenus par amplification PCR à l'aide d'amorces correspondant à des régions conservées, nous a permis de constater l'expression dans la racine de chicorée d'une famille multigénique très étendue. La différence observée d'un prélèvement à l'autre de la fréquence relative des isoformes clonées nous a fait soupçonner une possible différence de niveaux de transcrits de certaines d'entre elles au cours de la saison, CiFr06 semblant par exemple plus représentée pendant la période précédant la baisse de température. D'autres, comme CiFr02 et CiFr05, seraient par contre plus présentes après l'exposition au froid. Cependant, l'aspect purement qualitatif de cette démarche reposant sur le séquençage aléatoire de colonies bactériennes transformées et le nombre restreint de prélèvements sur lesquels nous avons travaillé, ne permettent pas d'établir de corrélation entre l'expression de l'une ou l'autre de ces isoformes avec les variations de température.

La RT-PCR semi-quantitative réalisée sur l'isoforme CiFr06 spécifiquement, montre que le taux de transcrits est important lors des deux premiers prélèvements (début août) avant de baisser entre le 24 août et le 30 novembre, pour ensuite augmenter de nouveau à partir du 14 décembre, c'est à dire quelques semaines après la première exposition à une température égale ou inférieure à 0°C. Dans les deux cas où CiFr06 est sur-exprimée, la plante s'est trouvée dans une situation de stress : stress lié à la chaleur dans le cas des premiers prélèvements, stress consécutif à l'exposition au froid dans le cas des derniers prélèvements. Le tableau des relevés de température (Figure 1, page 37) nous montre que fin juillet – début août, les plants de chicorée ont été soumis à des températures maximales atteignant ou dépassant les 30°C. Une étude de Jeong et Housley (1990) a montré que les fructanes sont dégradés en conditions de températures élevées par une augmentation d'activité des invertases et une baisse d'activité des SST. Dans les deux situations (froid ou chaleur), le stress hydrique est impliqué ; l'hydrolyse de polyfructanes libère des sucres réduits qui, par leurs propriétés colligatives, permettent à la cellule de combattre ce stress. Les résultats obtenus pour CiFr06 par RT-PCR paraissent donc a priori plausibles.

L'isoforme CiFr05 présente, sur les 783 paires de bases séquencées, 98 % d'identité avec la 1 FEH-I publiée en 2000 par Van den Ende et coll.. Des analyses par Northern blot réalisées par ces derniers auteurs indiquent une augmentation du taux de transcrits lors du stockage des racines de chicorée à 1°C. La répartition en fréquence des clones d'ADNc séquencés (Fig. 22, page 42), suggérant la présence prédominante de CiFr05 après la baisse de température, pourrait à première vue conforter les résultats obtenus par l'équipe de Van den Ende. La RT-PCR semi-quantitative des taux de transcrits de CiFr05 que nous avons effectuée devait confirmer ces résultats.

Malheureusement, la RT-PCR spécifique de l'isoforme CiFr05 révèle un profil de transcription relativement variable en cours de saison. Les niveaux de transcrits présentent des pics les 27 juillet et 25 janvier ainsi que les 5 et 19 octobre, mais étonnamment pas en novembre – décembre, pendant les premières gelées. Or, si l'on s'en tient aux résultats de Van den Ende et coll., une augmentation de l'activité de cette exohydrolase ne se manifesterait qu'après exposition au froid. Si nos résultats sont exacts, on doit alors envisager l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle pour expliquer la différence entre le niveau de transcrit que nous observons avant octobre et activités rapportées dans l'article. Pour rappel, Claessens et coll. (1990) signalent l'absence d'activité de type inulinase dans la racine de chicorée avant la mi-octobre.

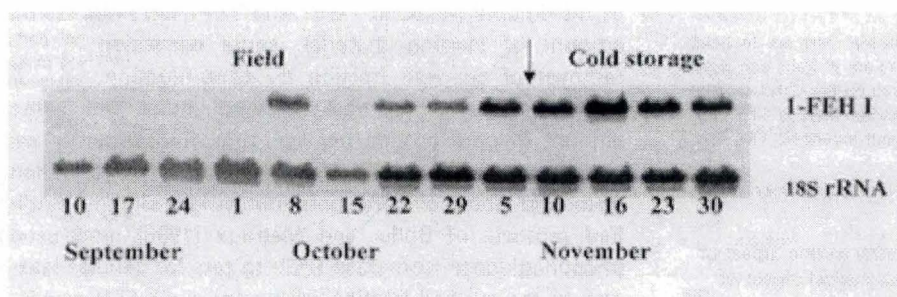


Figure 60 : Northern blot sur ARNm provenant de racine de chicorée avec sonde spécifique de la FEH-1 et sonde spécifique du standard ARNr 18S (Van den Ende *et al*, 2000).

1.5. Discussion

La première conclusion au vu de nos résultats, mais également de ceux obtenus à partir des échantillons 3 et 10, est qu'il y a un grand nombre d'invertases différentes et qu'elles n'ont peut-être pas la même fréquence de distribution d'un échantillon à l'autre.

Cependant, il est impossible de comparer les échantillons entre eux car le nombre de clones analysés pour chacun des prélèvements est insuffisant pour assurer un échantillonnage valable et comparable au sein de chacune des populations de fragments amplifiés. Par ailleurs, nous n'avons aucune garantie quant à la représentativité de la banque amplifiées.

En analysant les résultats obtenus avec les échantillons 3 et 10, on peut constater que CiFr06 est largement dominant dans l'échantillon 3, alors qu'il est peu présent dans les échantillons après la baisse de température. Trois des huit séquences trouvées au niveau des échantillons 6 et 7 correspondent d'ailleurs à cette isoforme. Il se pourrait qu'elle soit spécifiquement exprimée avant la baisse de température. L'observation inverse est faite pour CiFr05, qui est présente surtout après le coup de froid, dans l'échantillon 10. Cette isoforme présente en fait 98 % d'identité avec la séquence de la FEH-1 de *C. intybus* publiée en 2000 par Van den Ende. Cette protéine, pour rappel, est présente lors du stockage à basse température (1°C). Les résultats obtenus avec l'ARNm des prélèvements 3 et 10 rejoindraient donc les résultats obtenus publiés. Cependant, 4 séquences de CiFr05 sur 8 au total se retrouvent dans les échantillons 6 et 7 contre seulement 2 sur 23 pour l'échantillon 13 (Tableau 4). Ce qui nonobstant les réserves mentionnées au paragraphe précédent, pouvait suggérer une contradiction avec les observations pour les échantillons 3 et 10.

Nous avons travaillé avec des amorces dégénérées construites sur base de séquences d'autres espèces. Nous ne pouvons donc pas affirmer que ces amorces vont s'hybrider avec la même efficacité sur toutes les isoformes : elles pourraient aller s'hybrider plus facilement sur certaines séquences et moins sur d'autres. Les fréquences de clones présentées dans l'histogramme de la figure 22 ne peuvent donc absolument pas être considérées comme représentatives des niveaux de transcrits des gènes d'invertases exprimés dans la racine.

En résumé, nous devons donc être particulièrement prudent avant d'affirmer qu'une isoforme est spécifique d'un état physiologique de la plante, consécutif à une baisse de température. Premièrement les données ne sont pas quantitatives car les banques amplifiées ne sont pas représentatives et le nombre de séquences obtenues par prélèvements n'est pas assez élevé. Deuxièmement, nous ne sommes pas sûr d'avoir pu amplifier toutes les séquences connues d'invertases et ce, avec la même fréquence. Enfin, nos données ne recouvrent pas tous les prélèvements.

En réalisant une RT-PCR semi-quantitative par la suite, certains de ces problèmes ont pu être résolus : nous avons ainsi pu étudier l'expression d'une seule isoforme à la fois dans les 14 prélèvements, permettant une comparaison entre ceux-ci.

IV. Conclusion et Perspectives

Au cours de ce travail, nous avons pu cloner des séquences encore inconnues d'invertases de *C. intybus*. Pour deux d'entre elles, nous avons étudié le profil de transcription au cours de la saison de végétation. Aucune approche sensible et spécifique de la transcription n'avait jamais été rapportée dans la littérature chez la chicorée industrielle. Au vu de nos résultats, nous ne pouvons toutefois pas affirmer de manière définitive que la surexpression d'une des isoformes étudiées est caractéristique de la baisse de température.

Une recherche d'autres isoformes est envisageable dans les prélèvements qui n'ont pas encore fait l'objet d'investigation. Cela permettrait d'avoir à disposition un maximum d'isoformes existantes.

La poursuite des expériences de RT-PCR semi-quantitative ainsi que leur extension à l'ensemble des isoformes isolées nous permettra de brosser un tableau plus complet du rôle de chacune de ces isoformes. L'étude des variations du niveau d'expression protéique de chacune de ces isoformes peut également être envisagée. Cette dernière approche nécessitera cependant beaucoup plus de moyens et l'élaboration d'outils de détection spécifiques.

Nous disposons d'une courte séquence du promoteur de CiFr5. La poursuite de cette recherche et son extension à d'autres séquences pourrait permettre l'identification de séquences de régulation sensibles au froid ou à d'autres facteurs.

Enfin, une recherche des extrémités 5' et 3' de chaque isoforme pourrait également être réalisée. Disposer des séquences complètes permettra de prendre connaissance de toutes les différences entre isoformes et d'envisager éventuellement leur expression en système hétérologue. Les enzymes ainsi produites permettent de disposer d'une et une seule isoforme utilisable pour des caractérisations fines de leur activité. En effet, les propriétés physico-chimiques des protéines présentes au sein de la superfamille des invertases sont, pour certaines, tellement proches, que la purification à l'homogénéité est pratiquement impossible.

En conclusion, il apparaît que de nombreuses pistes restent encore à explorer afin de définir un modèle précis des conditions dans lesquelles s'enclenche la dégradation de l'inuline dans la chicorée industrielle.

V. Annexes

Annexe 1 : prélèvements *Cichorium intybus* 99-00

PRELEVEMENT	DATE	CONCENTRATION
1	27.07.99	1,51 µg/µl
2	10.08.99	1,084 µg/µl
3	24.08.99	1,864 µg/µl
4	07.09.99	1,328 µg/µl
5	21.09.99	3,256 µg/µl
6	05.10.99	1,288 µg/µl
7	19.10.99	1,240 µg/µl
8	02.11.99	0,832 µg/µl
9	16.11.99	0,952 µg/µl
10	30.11.99	1,972 µg/µl
11	14.12.99	1,136 µg/µl
12	28.12.99	1,920 µg/µl
13	11.01.00	1,764 µg/µl
14	25.01.00	1,552 µg/µl

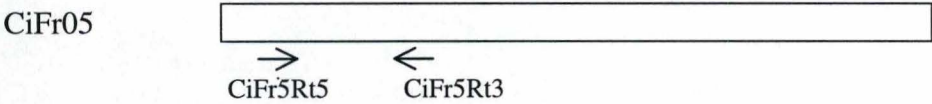
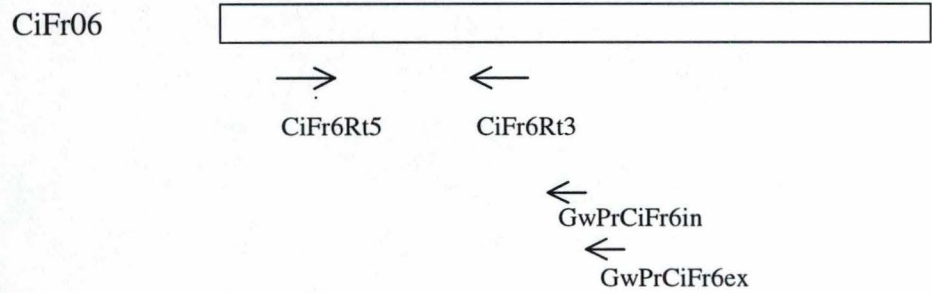
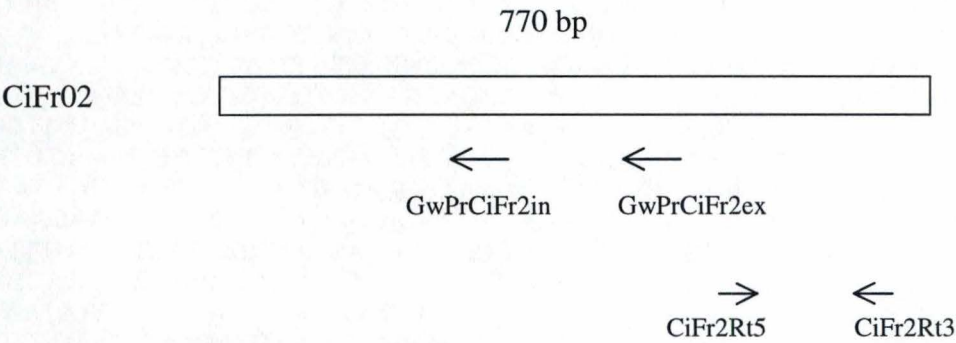
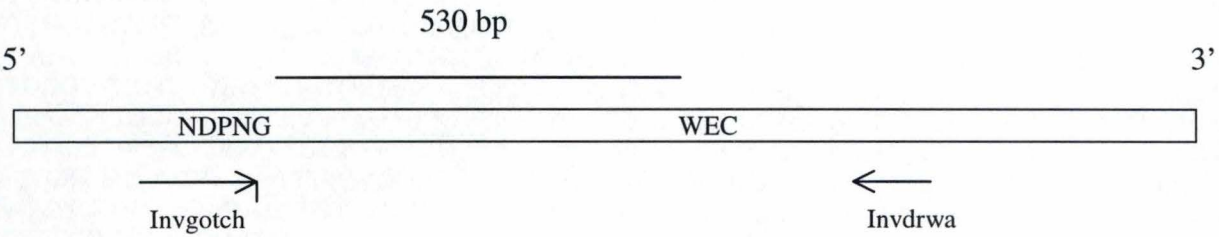
Les concentrations indiquées sont relatives à l'ARN total obtenu après extraction des échantillons congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C

Annexe 2 : caractéristiques des différentes amorces utilisées pour ce mémoire

Amorces	Séquence	bp	Tm (2 AT + 4 GC)	Tm % GC	% GC
CiUbiRt5	5'-CAA-CGT-CTT-CAC-GAA-GAT-C-3'	19	58°C	43°C	47,37
CiUbiRt3	5'-CGA-TTA-CAA-CAT-CCA-GAA-GG-3'	20	56°C	47°C	45
CiNDTub5	5'-ACC-AGA-TCG-GAG-CTA-AGT-TC-3'	20	60°C	49°C	50
CiNDTub3	5'-GAT-CAA-CTC-AGC-ACC-TTC-AG-3'	20	60°C	48°C	50
CiFr06Rt3	5'-TCT-CTG-AAG-TCA-TCT-GGT-TC-3'	20	58°C	48°C	45
CiFr06Rt5	5'-TCG-CCA-TTG-CCC-CAA-CTG-AT-3'	20	62°C	51°C	55
CiFr05Rt3	5'-GTC-AGA-GAG-ATT-TTT-AGG-GAA-C-3'	22	62°C	49°C	40,91
CiFr05Rt5	5'-ACT-CTG-GGG-CAA-CAT-TTC-T-3'	19	58°C	47°C	47,37
GwPrCiFr6ex	5'-TCT-CTG-AAG-TCA-TCT-GGT-TGG-ATA-3'	24	68°C	51°C	41,67
GwPrCiFr6in	5'-GGG-AAG-GTT-TAT-GAC-GGG-ATT-TCG-3'	24	72°C	54°C	50
GwPrCiFr2ex	5'-GTT-CTT-TTG-GGT-ATA-ACG-CCC-GTG-3'	24	72°C	54°C	50
GwPrCiFr2in	5'-CAT-TCA-CGA-AGG-AAC-GGG-TCC-3'	21	66°C	53°C	57,14
Invgotch	5'-YTG-GAT-GAA-CGA-TMC-NAA-YGG-W-3'	22	—	—	36,36
Invdrwa	5'-TCR-WAR-AAY-GWC-TTK-GAW-CGA-TA-3'	23	—	—	26,09
CiFr02Rt3	5'-GCA-AAA-CAG-TCG-TCT-TTA-AG-3'	20	56°C	46°C	40
CiFr02Rt5	5'-CTC-AGT-CCA-AAA-GAA-CCT-TAA-3'	23	58°C	47°C	38

Annexe 3 : site d'hybridation des amorces sur les différentes séquences

FEH-1 :

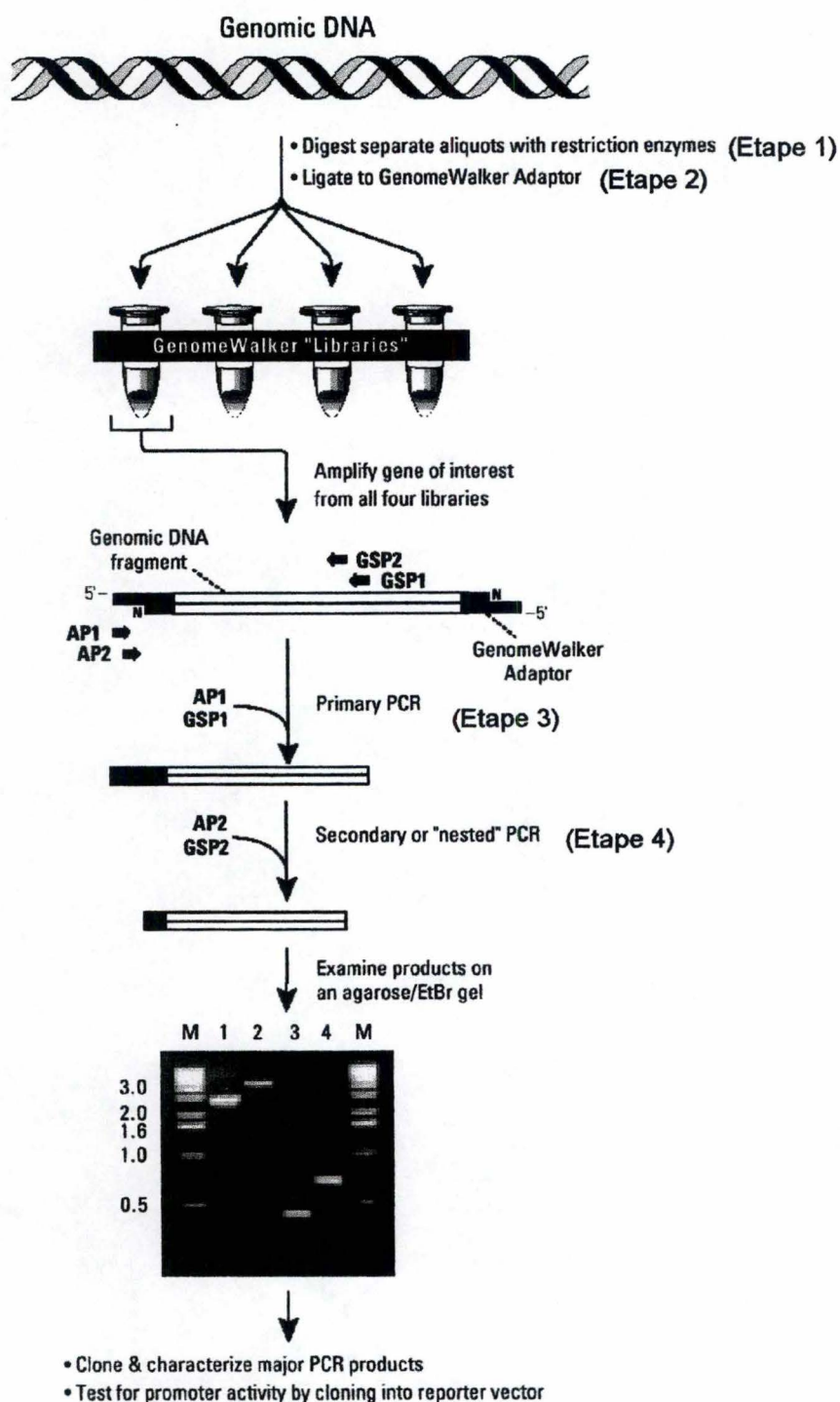


Cichorium intybus mRNA for fructan 1-exohydrolase I (1-FEH I, exo-inulinase)

>AJ242538

GTTCTTTTCTTTTCACGATCATTGGTGAGTTAATAAACCTGTCAGATCGACACTGAACAATGTGCTCA
GAAAGAAGGGTAAAAGAGATACTTGGCATTGTTGGGTTCTCTCTTTTGCTTAGTTTGGGTTTCAGAATGGT
GTTGGAGTTCATTCATCATCTCCACAGAAGAGTCGCAGCCTTACAGGACTGGCTTCCACTTCCAGCCT
CCTAAAACTGGATAAACGATCCTAACGGACCCATGTACTTCAATGGAGTTTACCATCTGTTCTACCA
ATACAACCCTTACGGTCCACTCTGGGGCAACATTTTCATGGGGTCATTCCATTTTCATATGATCTAGTGAA
CTGGTTTCTTCTCGAACCAGCTCTCAGTCCAAAAGAACCTTATGACATCAATGGCTGCCTGTCAGGTTT
AGCCACGATCCTACCCGGGCCACGGCCCATTAATTCTATATACCGGTCAAGACGTAAACAATAGTCAGG
TTCAGAACCTGGCCTTCCCTAAAAATCTCTCTGACCCTCTTTTGAAAGAGTGGATAAAATGGTCGGGTA
ACCCTTTGCTGACCCCCGTGATGACATTAAAGCTGGACAATTCCGTGATCCATCAACGGCTTGGATG
GGTCCGGATGGAAAATGGAGGATTGTGATCGGAAGTGAGATAGATGGTCATGGAACCGCACTTTTGTA
TCGTAGTACGAATGGTACAAAAGTGGATTCCGTCCAAAAAACCTTTGCACTTTTCTAGTAAAACGGGTA
TGTGGGAGTGTCTGACTTTTATCCTGTTACTAATGGTGACAAAAAGGGTCTTGACACATCTGTTCAAG
GGAATAACACACTTCATGTTCTCAAAGTAAGCTTCAATAGTCGTGAGTATTATGTAATCGGCACCTATG
ATCCAATAAAAAGATAAGTTTTCTGTGGTTACTAACGACTTCATGGTTAGTAACACACAATTTTCAGTACG
ATTATGGGAGGTATTATGCTTCAAATCGTTTTACGATAGTGTGAATCAGAGAAGGGTTCATATGGGGA
TGGGTTAATGAAGGTGATAGTGAATCAGATGCTGTCAAGAAAGGGTGGTCTGGCCTTCAGTCGTTTCC
TAGGAGCATCTGGCTTAGCAATAACCGGAAACAGTTGGTACAATGGCCAGTGGACGAAATACTGAAA
CTACGCACAAAACAGGTAAATATCACTAATAGAGAACTTGCGGCTGGTGAGCTACTCAAAATACCGAG
CATCACGGCTTCACAGGCTGATGTAGAAGTGTCAATTTAGTTTGACGAATCTGACCGAAATCGAACTGA
TAGATTTCAGAAGTTGTTGATCCCCAACTTCTTTGTGCACAAAAGAATGTTTCTATCAGTGGGAAGTTCG
GCCCTTTCGGTATGCTGATTTTAGCTTCAAAGAACTTGACTGAACAACTGCGGTTTTCTTTTCGAGTGT
TTAAAGGCCCTAACAAGTTCCTCGTACTCATGTGCAGTGATCAAAGCAGGTCTTCAATTGCACAAGAA
GTGGACAAAAGCATCTACGGAGCTTTTCTTGATTTGGACCCTCTACACGAGAAGATCCCGCTAAGAAG
CTTGATCGATCATTCAATTGTCGAAAGTTTTGGTGGAGAAGGAATTGCATGTATCACCTCTAGAGTTTA
TCCAAAGCTAGCTATTAATGAGCAAGCTGAGCTTTACGTATTTAACAATGGCACACAGAGTGTAATA
TGTCGACTTTAAATGCATGGAGCATGAAGAGGGCACAAATAGTTTCTATAGGCTAACAACATATAAT
GTTCTAGTAACTATAACCTAGTTTTTGATAATATGTTTTTAATAAGATGTGGCTGTAGTATTAATGGTT
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Annexe 4: Les différentes étapes de GenomeWalker (Eurogentec)



VI. Bibliographie

1. **Balk, P. and de Boer, A.** (1999) Rapid stalk elongation in tulip and the combined action of cold-induced invertase and the water-channel protein γ TIP. *Planta* 209: 346-354.
2. **Bonnett, G., Sims, I., John, J. and Simpson, R.** (1994) Purification and characterization of fructans with β -2,1- and β -2,6-glycosidic linkages suitable for enzyme studies. *New Phytol.*, **127**, 261-269.
3. **Bournay, A-S., Hedley, P., Maddison, A., Waugh, R. and Machray, G.** (1996) Exon skipping induced by cold stress in a potato invertase gene transcript. *Nucleic Acids Research*, Vol. 24, No.12, 2347-2351.
4. **Blobel, G.** (1980) Intracellular protein topogenesis. *PNAS USA*. **77**, 1496-1500.
5. **Bray, E., Bailey-Serres, J. and Weretilnyk, E.** (2000) Response to Abiotic Stresses. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds American Society of Plant Physiologists.
6. **Bremer Kare** (1994) Classification of the Asteraceae. *Cladistic* **10**, 295-304.
7. **Chambert R., Petit-Glatron MF** (1991) Polymerase and hydrolase activities of *Bacillus subtilis* levansucrase can be separately modulated by site-directed mutagenesis. *J. Biochem.* **279** : 35-41.
8. **Claessens, G., Van Laere, A. and De Proft, M.** (1990) Purification and properties of an inulinase from Chicory roots. *Journal of Plant Physiol.* Vol. 136.pp.35-39.
9. **Côme Daniel** (1992) Les végétaux et le froid. Collection Méthode Edition Hermann.
10. **Dardis, A., Saraco, N., Rivarola, MA, Belgorosky, A.** (1999) Decrease in the expression of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene in human adrenal tissue during prepuberty and early : implications for the mechanism of adrenarche. *Pediatr Res* Mar. ;45(3) :384-8.
11. **De Halleux, S. and Van Cutsem, P.J.** (1997) Cloning and sequencing of the 1-SST cDNA from Chicory roots. *Plant Physiol.* **113**, 1003.
12. **De Hertogh and LeNard** (1993) The physiology of flowers bulbs. Elsevier Science Publishers. 617-682.
13. **Delzenne, N. M. and Roberfroid, M. R.** (1994) Physiological Effects of Non-Digestible Oligosaccharides. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, **27**, 1-6.
14. **De Roover, J., Van Laere, A., De Winter, M., Timmermans, J., Van den Ende, W.** (1999) Purification and properties of a second fructan exohydrolase from the roots of *Cichorium intybus*. *Physiol. Plantarum* **106**: 28-34.
15. **Ebskamp, M., van de Meer, I., Spronk, B., Weisbeek, P., Smeekens, S.** (1994) Accumulation of fructose polymers in transgenic tobacco. *Biotechnol.* Vol. 12 : 125-133.

16. **Freeman, W., Walker, S., Vrana, K.** (1999) Quantitative RT-PCR : Pitfalls and Potential. *Biotechniques*. 26 :112-125.
17. **Frehner, M., Keller, F., Wiemken, A. and Matile, P.** (1994) Localization of the fructan metabolism in the vacuoles from *H. tuberosus*. *J. Plant Physiol.* **116**, 197-208.
18. **Gibson, G. and Roberfroid, M. B.** (1994) Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota Introducing the Concept of Prebiotics. *American Institute of Nutrition*, 1402-1412.
19. **Goetz, M. et Roitsch, T.** (1999) The different pH optima and substrate specificities of extracellular and vacuolar invertases from plants are determined by a single amino-acid substitution. *The Plant J.* **20**(6), 707-711.
20. **Greiner, S., Rausch, T., Sonnewald, U., Herbers, K.** (1999) Ectopic expression of a tobacco invertase inhibitor homolog prevents cold-induced sweetening of potato tubers. *Nature Biotech.*, Vol. 17.
21. **Guldentops R.** (1994) La culture de la chicorée industrielle. Ministère de l'Agriculture : Administration de l'Agriculture et de l'Horticulture (Service Information).
22. **Hendry, G.A.F.** (1993) Evolutionary origins and natural functions of fructans- a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytol.* **123**, 3-14.
23. **Hendry GAF and Wallace RK** (1993) The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans. In M Suzuki, NJ Chatterton, eds, Sciences and Technology of Fructans. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 119-139.
24. **Hyde, J., Jurch, G., Baldwin, E., Echeverria, E.** (1999) Low temperature induction of acid invertase activity in flavedo tissue of late season grapefruit (*Citrus Paradisi*) *Scientia Horticulturae* 80 (1999) 49-56.
25. **Jeong, B. et Housley, T.** (1990) Fructan Metabolism in Wheat in Alternating Warm and Cold Temperatures. *Plant Physiol.* 93, 902-906.
26. **Kaufman, P., Ghosheh, S., Lacroix, D., Soni, S., Hikuma, H.** (1973) Regulation of invertase levels in *Avena* stem segments by gibberellic acid, sucrose, glucose, and fructose. *Plant Physiol.* **52**, 221-228.
27. **Kaur, N., Jain, H., Mann, P., Gupta, A. et Singh, R.** (1992) A comparison of properties of invertases and inulinase from chicory. *Plant Physiol. Biochem.* **30** (4), 445-450.
28. **Klann, E., Chatelat, R., Bennett, A.** (1993) Expression of Acid Invertase Gene Controls Sugar Composition in Tomato (*Lycopersicon*) Fruit. *Plant Physiol.* 103: 863-870.
29. **Klann, E., Yelle, S., Bennett, A.** (1991) Tomato Fruit Acid Invertase Complementary DNA. *Plant Physiol.* 99, 351-353.

30. **Koops, A. et Jonker, H.** (1994) Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus*: I. Fructan: fructan fructosyl transferase. *J. Exp. Bot.* Vol. 45, No 280, pp. 1623-1631.
31. **Krishnan, H. B., Blanchette, J. T., Okita, T. W.** (1984) Characterization of cell wall-bound and soluble forms of Wheat invertases. *Plant Physiol.*, 78, 241-245.
32. **Laurière, C., Laurière, M., Sturm, A., Faye, L. and Chrispeels, M.** (1988) Characterization of β -fructosidase, an extracellular glycoprotein of carrot cells. *Biochimie*, 70, 1483-1491.
33. **Livingston, D., Chatterton, J. and Harrison, P.** (1993) Structure and quantity of fructan oligomers in oat (*Avena* spp.). *New Phytol.*, 123, 725-734.
34. **Livingston, D. and Henson, A.** (1998) Apoplastic Sugars, Fructans, Fructan exohydrolase, and Invertase in Winter Oat: Responses to Second-Phase Cold Hardening. *Plant Physiol.* 116:403-408.
35. **Livingston, D., Knievel, D. and Gildow, F.** (1994) Fructan synthesis in oat: I. Oligomer accumulation in stems during cold hardening and their *in vitro* synthesis in a crude enzyme extract. *New Phytol.* 127, 27-36.
36. **Malcolm Campbell** (2001) Spacial and temporal regulation of lignification. Oral communication. PPC. Added value products from plants 2 : cell wall components. University of York. 21-23 March 2001.
37. **Marx SP, Nosberger J, Frehner M.** (1997a) Seasonal variation of fructan- β -fructosidase activity and characterization of a β -(2-1)-linkage-specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke. *New Phytol.* 135 : 267-277.
38. **Marx SP, Nosberger J, Frehner M.** (1997b) Hydrolysis of fructan in grasses : a β -(2-6)-linkage-specific fructan- β -fructosidase from stubble of *Lolium perenne*. *New Phytol.* 135 : 279-290.
39. **Menke, U. and Mueller-Roeber, B.** (2001) RNA fingerprinting of specific plant cell types : adaptation to plants and optimization of RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR). *Plant mol. Biol. reporter* 19 : 33-48.
40. **Nelson, C.J. and Smith, D.** (1986) Fructan: their nature and occurrence. *Curr. Top. Plant Biochem. and Physiol.* Vol.5: 1-16.
41. **Öngen-Baysal, G., Sukan, S., Vassilev, N.** (1994) Production and properties of inulinase from *Aspergillus niger*. *Biotechn. Letters* Vol. 16 No3, pp.275-280.
42. **Pilon-Smits EAH, Ebskamp MJ, Paul MJ, Jeuken MJW, Weisbeek, PJ, Smeekens, SCM** (1995) Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.* 107 : 125-130.
43. **Pollock, C. et Chatterton, N.** (1988) Fructans. *The biochem. of Plants.* Vol. 14. Academic Press, 1988. Jack Preiss, Editor.

44. **Pressman, E., Schaffer, A., Compton, D., Zamski, E.** (1994) Carbohydrate Content of Young Asparagus Plants as Affected by Temperature Regimes. *J. of Plant Physiol.* Vol. 143. pp.621-624.
45. **Praznik W. and Beck RHF** (1985) Application of gel permeation chromatographic systems to the determination of the molecular weight of inulin. *J Chromatogr.* **348** : 187-197.
46. **Puebla, A., Salerno, G. L. and Pontis, G. H.** (1997) Fructan metabolism in two species of *Bromus* subjected to chilling and water stress. *New Phytol.*, **136**, 123-129.
47. **Rietvel, P., Wilkinson, C., Franssen, M., Balk, P., van der Plas, L., Weisbeek, P., de Boer, A.** (2000) Low temperature sensing in tulip is mediated through an increased response to auxin. *J. of experim. Bot.* Vol.51, No.344, pp.587-594.
48. **Roberfroid, M. B., Bornet, F., Bouley, C. and Cumming, J. H.** (1995) Colonic Microflora: Nutrition and Health. *Nutrition reviews*, Vol. 53, No. 5.
49. **Roitsch, T. and Tanner, W.** (1995) Cell Wall Invertase: Bridging the Gap. *Botanica Acuta* 109 90-93.
50. **Unger, C., Hardegger, M., Lienhard, S., Sturm, A.** (1994) cDNA Cloning of Carrot (*Daucus carota*) Soluble Acid β -Fructofuranosidases and Comparison with the Cell Wall Isoenzyme. *Plant Physiol.* 104: 1351-1357.
51. **Santoiani, C., Tognetti, J.A., Pontis, H.G., Salerno, G.L.** (1993) Sucrose and fructan metabolism in wheat roots at chilling temperatures. *Physiologia Plantarum* 87:84-88.
52. **Simmen, U., Obenland, D., Boller, T. and Wiemken, A.** (1993) Fructan Synthesis in Excised Barley Leaves. *Plant Physiol.*, 101: 459-468.
53. **Sprenger, N., Bortlik, K., Brandt, A., Boller, T. and Wiemken, A.** (1995) Purification, cloning, and functional expression of sucrose:fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. *Plant Biology* , Vol. 92. pp. 11652-11656.
54. **Stitt Mark** (1994) Manipulation of carbohydrate partitioning. *Curr. Opin. Biotechn.*, **5**: 137-143.
55. **Sturm, A., Chrispeels, M.** (1990) cDNA Cloning of Carrot Extracellular β -Fructosidase and Its Expression in Response to Wounding and Bacterial Infection. *The plant cell*, Vol. 2, 1107-1119.
56. **Sturm, A. and Tang, G.** (1999) The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. Review, trends in plant science, Vol.4 N°10.
57. **Sturm, A.** (1999) Invertases. Primary Structures, Functions, and Roles in Plant Development and Sucrose Partitioning. *Plant Physiol.* Vol. 121, pp. 1-7.

58. **Suzuki, M. and Pollock, C.** (1985) Extraction and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in timothy. *Canadian J. of Bot.* **64**: 1884-1887.
59. **Tang, G., Luscher, M. and Sturm, A.** (1999) Antisense Repression of Vacuolar and Cell Wall Invertase in Transgenic Carrot Alters Early Plant Development and Sucrose Partitioning. *The plant cell*, Vol. 11, 177-189.
60. **Tymowska-Lalanne, Z., Kreis, M.** (1998) The Plant Invertases: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. *Advances in Botanical Research* Vol. 28: 71-117.
61. **Van den Ende, W., De Roover, J., Van Laere, A.** (1996) In vitro synthesis of fructafuranosyl-only oligosaccharides from inuline and fructose by purified chicory root fructan :fructan fructosyltransferase. *Physiol. Plant* **97** : 346-352.
62. **Van den Ende, Michiels, A., De Roover, J., Verhaert, P., Van Laere, A.** (2000) Cloning and functional analysis of chicory root fructan exohydrolase I (1-FEH I): a vacuolar enzyme derived from a cell-wall invertase ancestor? Mass fingerprint of the FEH I enzyme. *The Plant J.* **24**(4), 447-456.
63. **Van den Ende, W and Van Laere, A.** (1995) Purification and properties of a neutral invertase from the roots of *Cichorium intybus*. *Physiologia Plantarum* **93**: 241-248.
64. **Van den Ende, W and Van Laere, A.** (1996) De-novo synthesis of fructans from sucrose in vitro by a combination of two purified enzymes (Sucrose:sucrose fructosyl-transferase and Fructose:fructose fructosyltransferase) from chicory roots. *Planta* **200**: 335-342.
65. **Van der Meer, I., Koops, A., Hakkert, J. and van Tunen, A.** (1998) Cloning of the fructan biosynthesis pathway of Jerusalem artichoke. *The Plant J.* **15**(4), 489-500.
66. **Vijn, I. and Smeekens, S.** (1999) Fructan: More than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol.*, Vol. 120, pp. 351-359.
67. **Weber, H., Borisjuk, L., Heim, U., Buchner, P., Wobus, U.** (1995) Seed Coat-Associated Invertases of Fava Bean Control Both Unloading and Storage Functions: Cloning of cDNAs and Cell Type-specific Expression. *The plant cell*. Vol.7, 1835-1846.
68. **Wiemken, A., Frehner, M., Keller, F. and Wagner, W.** (1986) Fructan metabolism, enzymology and compartmentation. *Curr. Top. Plant Biochem. and Physiol.* Vol. 5: 17-37.
69. **Wu, L., Karuppiyah, N. and Kaufman, P. B.** (1993) Kinetic induction of oat shoot pulvinus invertase mRNA by gravistimulation and partial cDNA cloning by the polymerase chain reaction. *Plant Molecular Biology*, **21**: 1175-1179.
70. **Yukawa, T., Kobayashi, M., Watanabe, Y., Yamamoto, S.** (1995) Studies on Fructan Accumulation in Wheat. *Jap. J. Of Crop Science*, Vol. LXIV, No 4
71. **Yukawa T., Watanabe, Y., Yamamoto, S.** (1995) Effects of Cold-Dark Treatment on Fructan Metabolism in Barley. *Jap. J. Of Crop Science*, Vol. LXIV, No2.

72. **Zrenner, R., Schuler, K., Sonnewald, U.** (1996) Soluble acid invertase determines the hexose-to-sucrose ratio in cold-stored potato tubers. *Planta*. 198(2) : 246-52.